UNIVERSITE D'ALGER

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année 1974 - No

Vitamine B12 et Acide Folique.

- Données récentes sur le mécanisme d'action dans la biosynthèse du DNA et dans la division cellulaire.

- Répartition intracellulaire.

THESE

pour le Doctorat en Médecine
présentée et soutenue publiquement
le 10 septembre 1974
PAR

AMOROUAYECHE Omar
né le 2 septembre 1946 à Khenchela

MEMBRES DU JURY

M. **A. BOER** Professeur de Biochimie — **Président**
Maître de Recherche au CNRS

M. **P. COLONNA** Professeur (Maladies du sang)
M. **M. BENMILOUD** Professeur (Endocrinologie)
M. **J.P. GRANGAUD** Maître de Conférences agrégé (Pédiatrie)
— **Membres**

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548212_0026

UNIVERSITE D'ALGER

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année 1974 - No

Vitamine B12 et Acide Folique.

- Données récentes sur le mécanisme d'action dans la biosynthèse du DNA et dans la division cellulaire.

- Répartition intracellulaire.

THESE

pour le Doctorat en Médecine
présentée et soutenue publiquement
le 10 septembre 1974
PAR

AMOROUAYECHE Omar
né le 2 septembre 1946 à Khenchela

MEMBRES DU JURY

M. **A. BOER** Professeur de Biochimie — **Président**
Maître de Recherche au CNRS

M. **P. COLONNA** Professeur (Maladies du sang)
M. **M. BENMILOUD** Professeur (Endocrinologie)
M. **J.P. GRANGAUD** Maître de Conférences agrégé (Pédiatrie)
— **Membres**

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et selon la tradition d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'oppobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

JE DEDIE CETTE THESE

A la mémoire de mon père

A ma mère

en témoignage de mon affection

A mes frères et soeurs

A toute ma famille

A tous mes amis

A tous ceux qui me sont chers

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur A. Gabr

Professeur de Biochimie,

Maître de Recherches au C.N.R.S.

Vous nous avez inspiré le sujet de ce travail et guidé tout au long de sa réalisation.

Permettez nous de vous exprimer notre admiration pour vos qualités de Chercheur et pour votre rigueur scientifique de même que notre reconnaissance pour l'aide précieuse que vous avez bien voulu nous apporter.

A Monsieur le Professeur P. COLONNA

Professeur de Clinique Hématologique

Vous avez, avec bienveillance, accepté de juger notre travail.

Nous avons toujours apprécié vos qualités de pédagogue et votre grande valeur de Clinicien.

Trouvez ici, l'expression de notre vive reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M. BENMILOUD

Professeur d'Endocrinologie

Nous vous exprimons notre vive reconnaissance pour votre enseignement précieux et clair.

Nous admirons votre sens de la recherche ainsi que vos qualités d'éminent Clinicien et sommes très sensibles à votre présence parmi nos Juges.

A Monsieur le Professeur J.P. GRANGAUD

Maître de Conférence, Agrégé en Pédiatrie

Nous vous remercions d'avoir bien voulu juger notre travail.

Nous saisissons cette occasion pour vous exprimer notre reconnaissance pour l'enseignement de qualité que vous nous avez dispensé pendant nos études aussi bien en biochimie qu'en pédiatrie.

A NOS MAITRES DES HOPITAUX, et

A NOS MAITRES DE LA FACULTE

A Mademoiselle A.M. LESNEY
Maître Assistante en Biochimie

que je remercie pour ses précieux conseils.

A ceux qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ce travail. En particulier, je tiens à remercier Madame OUDOS, Madame BELAHOUJA, Messieurs BENAI et TENANI pour leur précieuse aide technique.

E R R A T A

Dans le Tableau III	- Lire	Filtration sur étamine et centrifugation à 600 g. pendant 3 minutes.
Page 2 - ligne 14	- lire	sites d'intervention
Page 3 - ligne 21	- lire	Préparation des homogénats de foie
Page 7 - ligne 15	- lire	division cellulaire chez les ...
ligne 16	- lire	hématopoïèse
Page 8 - ligne 11	- lire	Anémies mégaloblastiques
ligne 2	- lire	travaux consacrés
ligne 17	- lire	un progrès décisif
Page 9 - ligne 3	- lire	Par RICKES et Collaborateurs
ligne 13	- lire	Plusieurs
Page 11 - ligne 9	- lire	Fonction Cétone
Page 12 - ligne 8	- lire	le N_5-N_{10} Méthylène-THF est d'abord déshydrogéné.
ligne 10	- lire	et ensuite transformé en présence de ...
Page 20 - ligne 1	- lire	Méthylène-THF se transforme en acide ...
Page 25 - ligne 8	- lire	Cet ion Cobalt
Page 40 - ligne 19	- lire	Enfin, quand le Lactobacillus-Leischmanii
Page 41 - ligne 10	- lire	l'ATP et un réducteur dithiol
Page 43 - ligne c)	- lire	génétique de la synthèse des précurseurs du DNA
Page 50 - ligne 1	- lire	Le problème
Page 51 - ligne 2	- lire	ceci la rapproche
Page 54 - ligne 9	- lire	anémies mégaloblastiques ont des ...
Page 55 - ligne 18	- lire	le cas d'Escherischia Coli
Page 61 - ligne 12	- lire	déficients en folates
Page 66 - ligne 17	- lire	type aryl-alkyl-phénol-polyoxyéthylénés
Page 72 - ligne 10	- lire	la teneur d'un facteur de croissance
Page 74	lire	détermination colorimétrique du ribose à l'orcinol
Page 87 - ligne 22	- lire	la répartition des folates et des ....

P R E M I E R E P A R T I E

P L A N

- PREMIERE PARTIE

I - INTRODUCTION

II - HISTORIQUE

III - ETUDE STRUCTURALE ET MECANISME D'ACTION DE L'ACIDE FOLIQUE ET DE LA VITAMINE B 12

1°) ACIDE FOLIQUE

a) - Structure

b) - Mécanisme d'action

. Transport des radicaux monocarbonés

. Phénomènes de réduction et d'oxydation des radicaux monocarbonés.

2°) VITAMINE B 12

A - STRUCTURE

a) Description du noyau Corrine

b) Le résidu 5' désoxyadénosyl

c) Description du pseudonucléotide

d) Rôle de l'ion cobalt

B - MECANISME D'ACTION

a) Etudes chimiques

. Synthèse du lien Carbone-Cobalt

. Clivage du lien Carbone-Cobalt

b) Réactions enzymatiques

. Cas du transfert de l'Hydrogène

. Cas du transfert des radicaux méthyles

. Synthèse de la méthionine

IV - ROLE DE LA VITAMINE B 12 ET DE L'ACIDE FOLIQUE DANS LA BIOSYNTHESE DU D.N.A. ET DANS LA DIVISION CELLULAIRE

1°) INTRODUCTION

2°) CAS DES SYSTEMES BACTERIENS

a) Etudes effectuées sur la ribonucléotide réductase

b) Sides d'intervention de la Ribonucléotide réductase et de la Thymidilate Synthétase dans la Biosynthèse du D.N.A.

c) Contrôle génétique de la synthèse des précurseurs du D.N.A.

d) Propriétés de la R.R. purifiée

e) Régulation allostérique de l'activite de la Ribonucléotide Réductase

f) Interrelations métaboliques entre folates et cobalamines dans la synthèse du DNA

. Biosynthèse de la méthionine
. Biosynthèse du dTMP à partir de l'U.T.P.

3°) OBSERVATIONS EFFECTUEES SUR EUGLENAGRACILIS Z

a) Carence en phase exponentielle
b) Carence en phase stationnaire
c) Discussion

4°) CAS DES CELLULES ANIMALES

a) Hépatome de NOVIKOFF
b) ASCITE d'EHRLICH
c) Foie de rat en régénération
d) Cas particuliers des cellules de la moelle osseuse
. Etude cytologique
. Etude biochimique
e) Observation effectuee sur les lymphocytes humains stimulés par une phyto-agglutinine

5°) DISCUSSION DES RESULTATS

- DEUXIEME PARTIE :

I - MATERIEL ET METHODES

1°) Préparation des homogénates de foie de rat
2°) Préparation des fractions cellulaires

3°) Préparation des noyaux

4°) Dosages microbiologiques

a) Généralités
b) Dosage des cobalamines totales
c) Dosage de la vitamine B 12
d) Dosage des folates totaux libres

5°) AUTRES DOSAGES

II - RESULTATS

1°) Distribution de la vitamine B 12 des cobalamines totales et de l'acide folique dans les fractions cellulaires

2°) Distribution de la vitamine B 12, des cobalamines totales et de l'acide folique au cours de la préparation des noyaux

a) observations morphologiques
b) Discussion des résultats

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES

INTRODUCTION

La division cellulaire normale est conditionnée par la synthèse adéquate des différents constituants organiques. Parmi eux, le DNA occupe une place centrale dans la mesure où il contient le programme génétique à partir duquel s'opèrent toutes les synthèses nécessaires à la mitose. Par conséquent, la moindre perturbation de la synthèse du DNA se répercute sur la division cellulaire. Les altérations de la mitose entraînent évidemment des troubles fonctionnels aussi bien au niveau d'une cellule que d'un organisme entier. Ces anomalies de la multiplication cellulaire sont plus critiques lorsqu'il s'agit de cellules à division relativement rapide comme celles de la moelle osseuse. En effet, dans ce cas, les troubles fonctionnels sont plus rapides à se déclarer et l'apparition d'anémies souvent graves en est la rançon habituelle. Toutes ces raisons ont conduit à rechercher les facteurs intervenant dans la synthèse du DNA. A l'heure actuelle, il est bien admis que parmi ces facteurs, les folates et les cobalamines jouent un rôle très important. De manière plus précise ces composés vitaminiques ont entre eux des interrelations métaboliques au niveau de la formation de la méthionine à partir de l'homocystéine, et du dTMP à partir de l'U.T.P., deux étapes fondamentales dans la principale voie de biosynthèse du DNA. Toutefois, ces interrelations métaboliques comportent encore quelques aspects mal connus. Ainsi, on ignore toujours l'influence précise que ces deux composés vitaminiques ont l'un sur l'autre, dans les voies de synthèse du DNA ; on ignore également le

rôle exact joué par la vitamine B 12 dans les processus de division cellulaire. Ce sont ces incertitudes qui pèsent encore sur le mécanisme d'action des cobalamines et des folates qui ont conduit à rechercher leur localisation intracellulaire. L'étude comparative de la répartition de ces facteurs et des systèmes enzymatiques dans lesquels ils pourraient être impliqués pour la synthèse du DNA devrait permettre de mieux comprendre leur mode d'action.

Dans une première partie, après un bref rappel historique, nous rappelons les données essentielles sur la structure de l'acide folique et de la vitamine B 12 - Le mécanisme d'action générale de ces facteurs est également étudié.

Un chapitre est consacré aux interventions de la vitamine B12 et des folates dans la biosynthèse du DNA et la division cellulaire chez les bactéries et les cellules animales. Les problèmes posés par le cas particulier de l'etythropoïèse sont également exposés. Ces observations sont comparées et discutées.

La deuxième partie de ce travail est consacrée à la répartition intracellulaire des Cobalamines et des folates. Le mode d'expérimentation utilisé est décrit, des résultats discutés et analysés.

- RAPPEL HISTORIQUE -

Ce sont des travaux consécrés à la pathogénie des anémies mégaloblastiques qui sont à l'origine de la découverte des facteurs vitaminiques, que sont : l'acide folique et la vitamine B 12.

- ACIDE FOLIQUE :

C'est en 1931, que L.Wills parvient à guérir des anémies macrocytiques tropicales par des extraits de foie privés de leur facteur anti-pernicieux et par la levure de bière (42). Un peu plus tard, en 1937, on a pu provoquer des anémies mégaloplastiques en administrant des régimes caroncés au singe (42), ceci a permi de mieux étudier le traitement. En 1938, STOCKSTAD et MANNING et plus tard, HOGGAN et PARROT en 1939, montrent que les extraits de levure de bière arrivent à réparer l'anémie et favorisent la croissance de poulets préalablement soumis à des régimes carencés (59).

En 1940, un progès décisif est obtenu par SNELL et PETERSON qui utilisent un microorganisme Lactobacillus Casei, pour tester le facteur de croissance se trouvant dans la levure de bière et dans le foie.

En 1941, MITCHELL et AL, isolent l'acide folique à partir de feuilles de végétaux tels que l'épinard d'où provient son nom, et l'identifient au facteur de croissance de L.CASEI.

En 1943 enfin, l'acide folique est obtenu à l'état

cristallisé par STOCKSTAD.

- VITAMINE B 12 :

La découverte en 1948, par RICKES étal, aux U.S.A. et presque simultanément par LESTER SMITH et PARKER en Angleterre, fut la conclusion de travaux consacrés plus particulièrement à l'étude de l'anémie pernicieuse.

Les premières observations remontent à COMBE en 1922, qui rapporte la cause de l'anémie observée chez un malade à une malnutrition elle-même consécutive à un "certain désordre digestif". C'est ensuite FLINT en 1860 qui oriente les recherches dans le domaine de la pathogénie des anémies mégaloblastiques, su l'atteinte de la muqueuse gastrique et par voie de conséquence sur les malabsorptions de facteurs pouvent être responsables de ce type d'anémies. Plus tard, S.FENWICK en 1870 et BIERMER en 1871, précisent le type carenciel de ces anémies. Depuis, plusieu travaux furent consacrés à l'étude de l'anémie pernicieuse en particulier par MINNOT, MURPHY, en 1920, qui ont fait des essais thérapeutiques à base d'extraits de foie. Plus tard, WHIPPLE et COHN, en 1928, ROBSHEIT et ROBBINS, en 1936, ont recherché dans les extraits de foie la fraction active dans l'anémie pernicieuse. Vers 1937, un facteur inconnu appelé "animal protein factor" permettant la croissance du porc et de la volaille fait défaut dans les premiers régimes industriels à base de céréales et autres végétaux. Il s'avère bientôt qu'il est identique au facteur antipernicieux des extraits de foie ou présente une composition très proche.

Mais, les extractions du facteur contenu dans les protéines animales sont difficiles de même que les tests effectués sur l'animal carencé ; par contre les progrès sont rapides à partir du moment où SHORB, en 1947, montre que ces extraits contiennent un facteur de croissance pour L. LACTIS DORNER. Un an plus tard, en 1948, la vitamine B 12 est obtenue à l'état cristallisé. Ce sont encore des expériences tendant à vérifier les besoins de croissance spécifique de divers microorganismes qui permettent d'identifier les diverses formes de folates à certaines des vitamines du groupe B agissant surtout en tant que coenzymes ; il existe plusieurs analogues de structure actifs. L'acitvité est fonction des particularités de structures de chacun des analogues ainsi que des réactions enzymatiques en cause et de ce fait toutes les espères de microorganismes ne sont pas sensibles au même titre à chacun des analogues (VALENCIA 1974) (59).

ETUDE STRUCTURALE ET MECANISME D'ACTION DE LA VITAMINE B 12 ET DE L'ACIDE FOLIQUE

1°) ACIDE FOLIQUE

a) STRUCTURE :

La figure 1 rappelle la structure de l'acide folique.

La molécule comporte trois parties (43) :

- Un noyau ptéridine bisubstitue dont le carbone quatre (C4) porte une foction cétone et le carbone (C2) une fonction amine
- Un résidu acide para-amino-benzoique relie au carbone six (C6) du noyau ptéridine par un pont -CH2-.
- Un résidu d'acide glutamique relié à l'acide para-amino-benzoique par une liaison peptidique CO-NH.

b) MECANISME D'ACTION :

L'acide folique intervient comme coenzyme dans :

- Les réactions de transfert des radicaux monocarbonés.
- Les phénomènes d'oxydo-réduction de ces mêmes radicaux monocarbonés.

. Transport des radicaux monocarbonés :

Le mécanisme concerne les radicaux suivants :

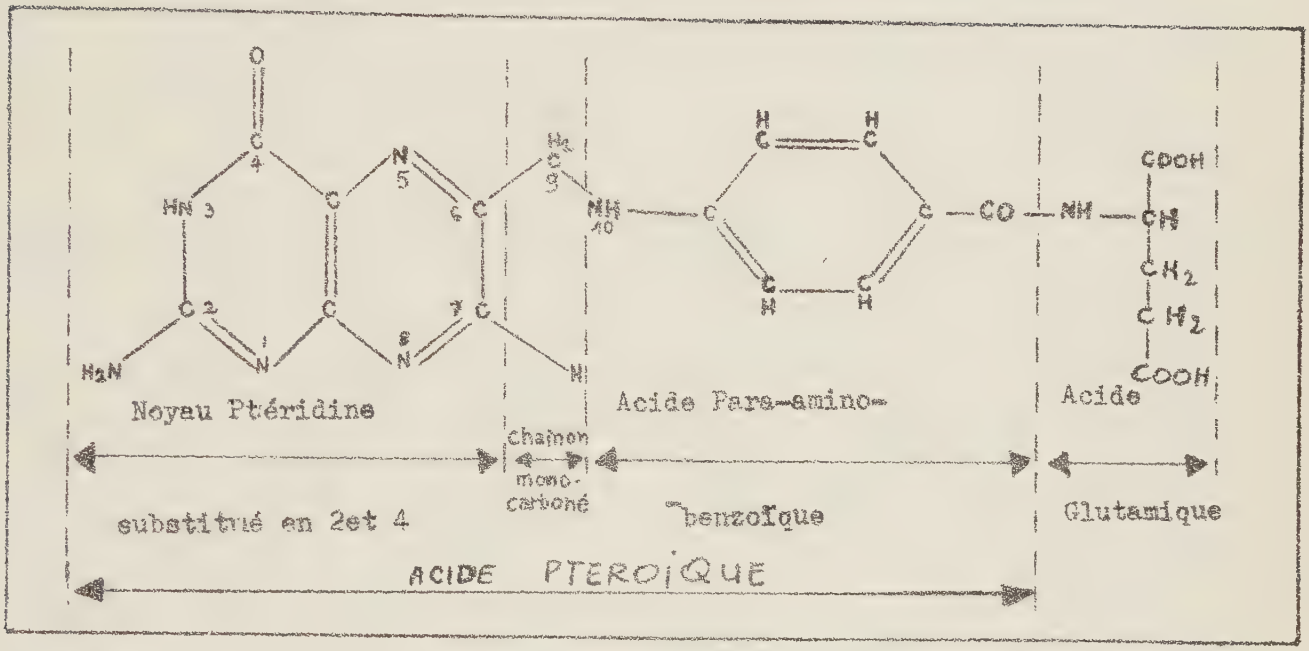
- Formyl

- Formimino
- Hydroxyméthyl
- Méthyl

Ces différents radicaux sont pris en charge par l'acide folique sous sa forme active qui est l'acide 5, 5, 7, 8 - Tétrahydrofolique (acide THF), (Figure 2), dont les atomes réactionnels sont les atomes d'azote cinq et dix (N5 et N10).

Dans l'exemple illustré à la figure 3, la molécule de THF prend en charge un radical monocarboné provenant de la serine ($CH_2OH-CH(COOH)-NH2$), (40), et se transforme en N5, N10-méthylène-tétrahydrofolate (figure 4) en permettant la formation d'une molécule de glycine ($H-CH(COOH)-NH_2$).

Le N5, N10-méthylène-THF intervient comme cofacteur de la thymidilate-synthétase lors de la transformation du dUMP en dTMP qui est une étape importante de la synthèse du DNA comme nous le verrons par la suite.



ACIDE PTEROIQUE - Glutamique

ou

ACIDE Folique

FIGURE 1 — STRUCTURE DE L'ACIDE FOLIQUE OU ACIDE PTEROIQUE-GLUTAMIQUE —

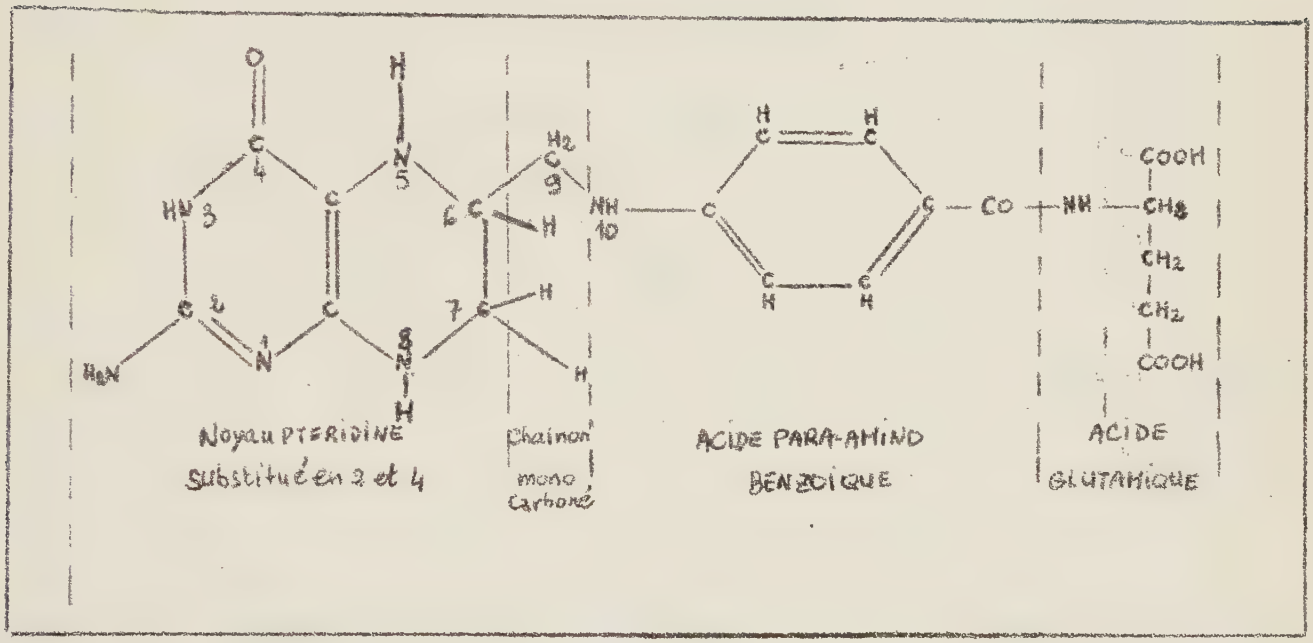


FIGURE 2 - ACIDE TETRAHYDROFOLIQUE

Remarque. Par rapport à l'acide folque, l'acide tétrahydrofolique comporte quatre atomes d'hydrogène en plus, situés sur les carbones (C_6 et C_7) et sur les azotes (N_5 et N_8).

MECANISME D'ACTION DE L'ACIDE FOLIQUE.

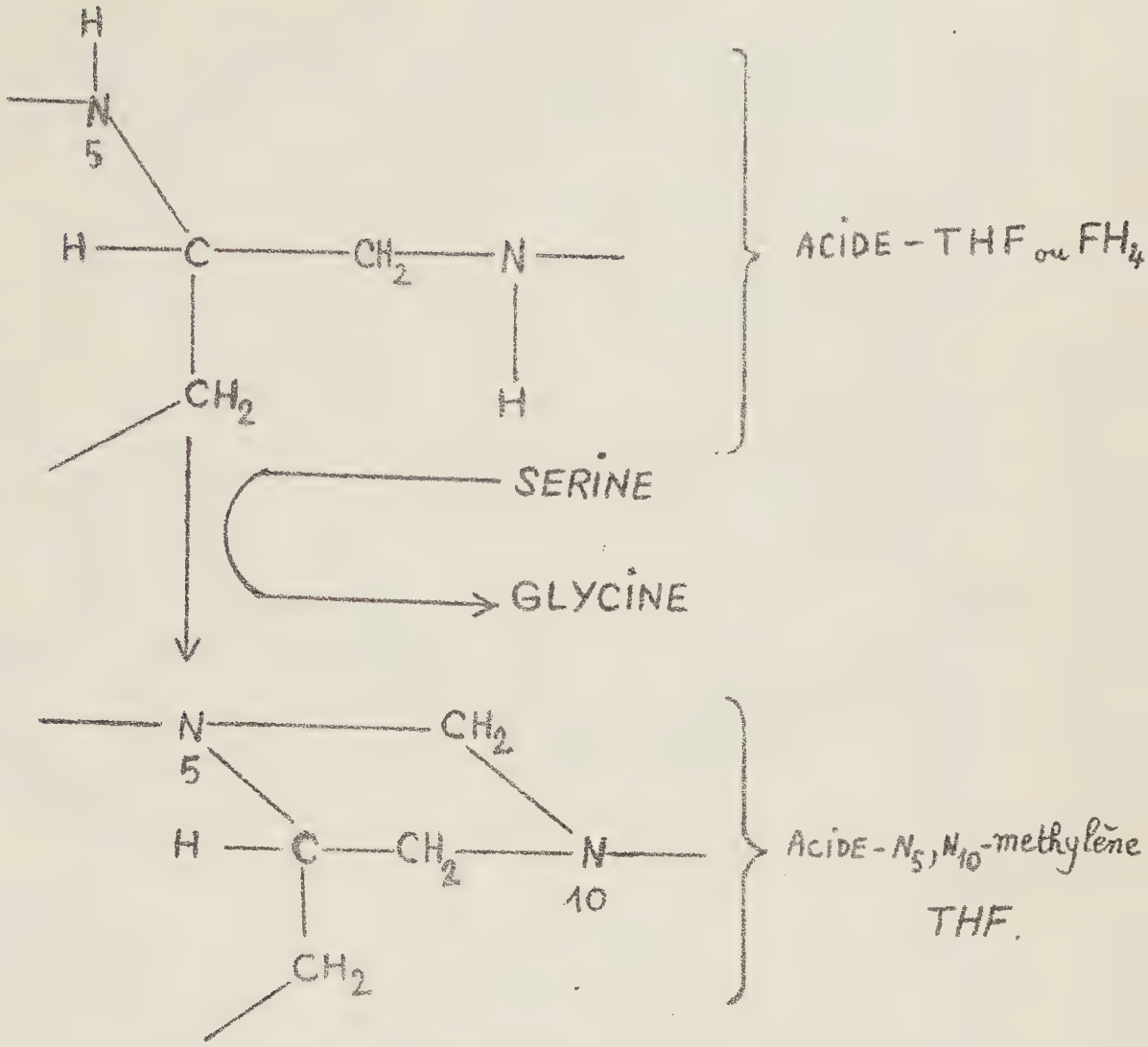


FIGURE 3 - TRANSPORT DES RADICAUX MONOCARBONES

L'acide tetrahydrofolique se transforme en acide N_5,N_{10}-Tetrahydrofolique-méthylène alors que la serine se convertit en glycine .

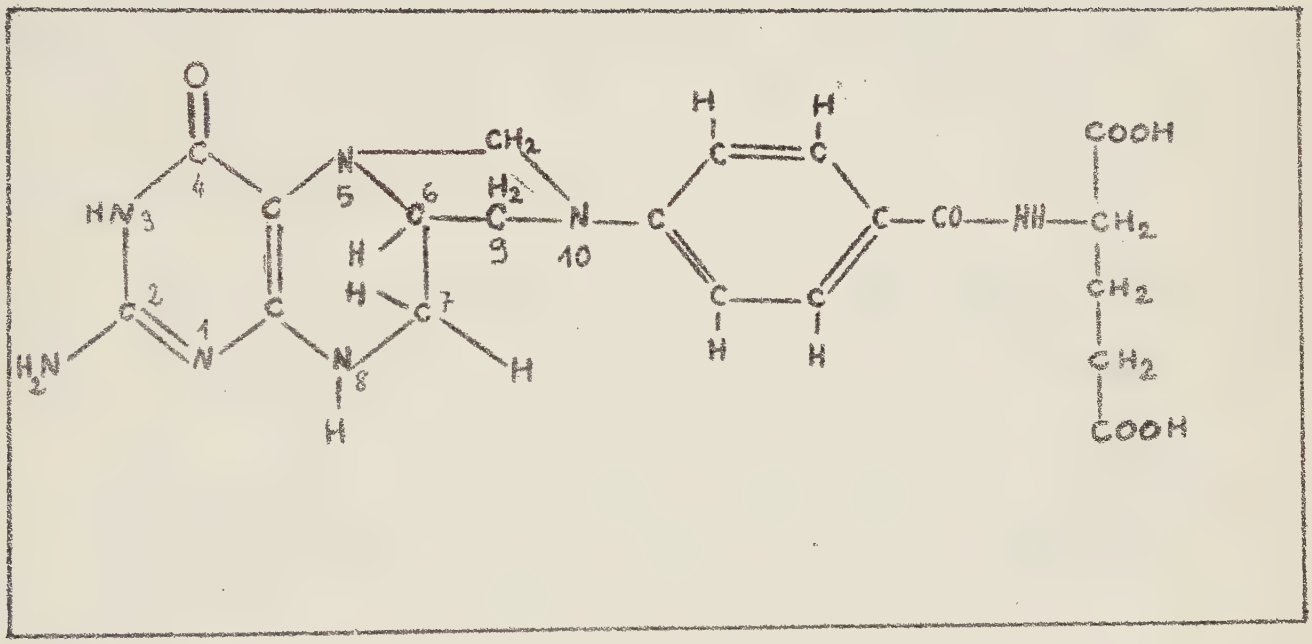


FIGURE 4 - ACIDE N_5,N_{10} -METHYLENE-TETRAHYDROFOLIQUE

. Phénomènes de réduction et d'oxydation des radicaux monocarbonés

La réduction qui permet la transformation du N5, N10-Méthylène-THF en N5-Méthyle-THF (figure 5) s'effectue en présence du cofacteur NAD réduit (40) la réaction est reversible, (figure 6).

L'oxydation du radical monocarboné exige quant à elle, l'apport d'énergie sous la forme d'ATP et permet la formation de l'acide formyl-THF (figure 7). Cette réaction peut être décomposée en deux étapes : (figure 7) :

- Le N5, N10-Méthylène-THF est d'abot déshydrogène en présence de NADP qui prend en charge les deux atomes d'hydrogène.

- Le Méthényle-Tétrahydrofolate (figure 8) obtenu, est ensuite en présence d'oxygène et d'ATP en Acide N5-Formyl-THF.

Les possibilités de l'acide 5, 6, 7, 8-Tétrahydrofolique sont multiples. Chacune de ses réactions est induite préférenciellement suivant l'étape du métabolisme par l'apoenzyme spécifique qui fonctionne avec l'acide tétrahydrofolique comme coenzyme.

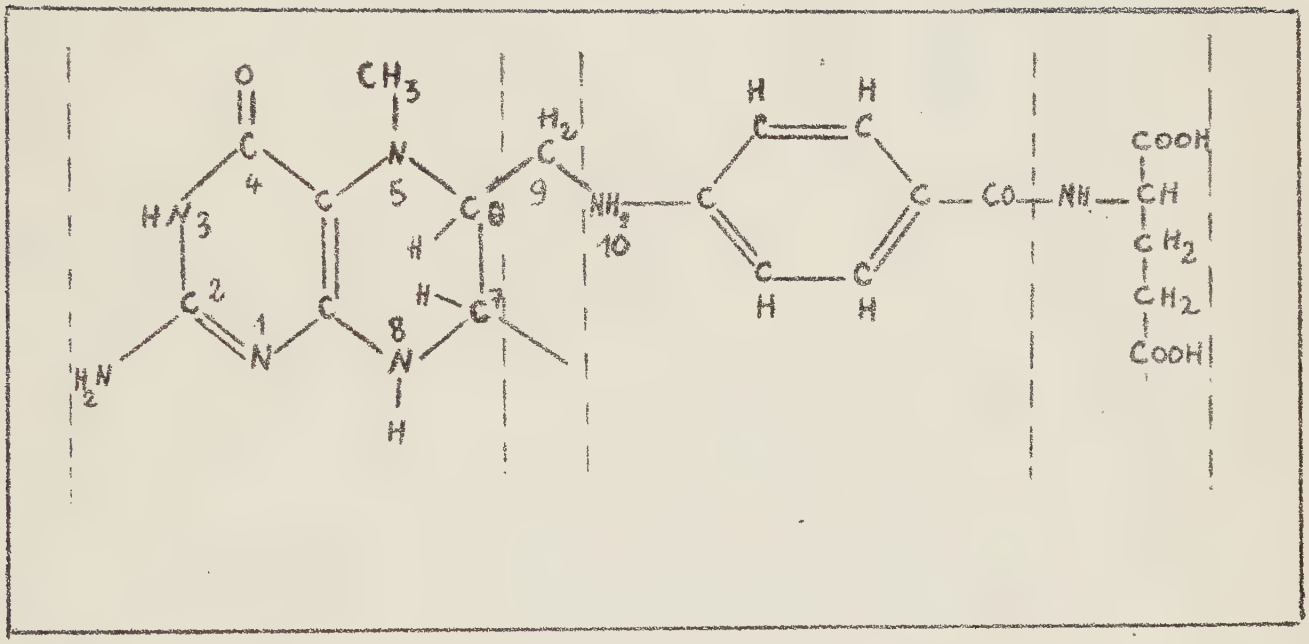


FIGURE 5 - ACIDE N_5-METHYL-TETRAHYDROFOLIQUE.

MECANISME D'ACTION DE L'ACIDE FOLIQUE.

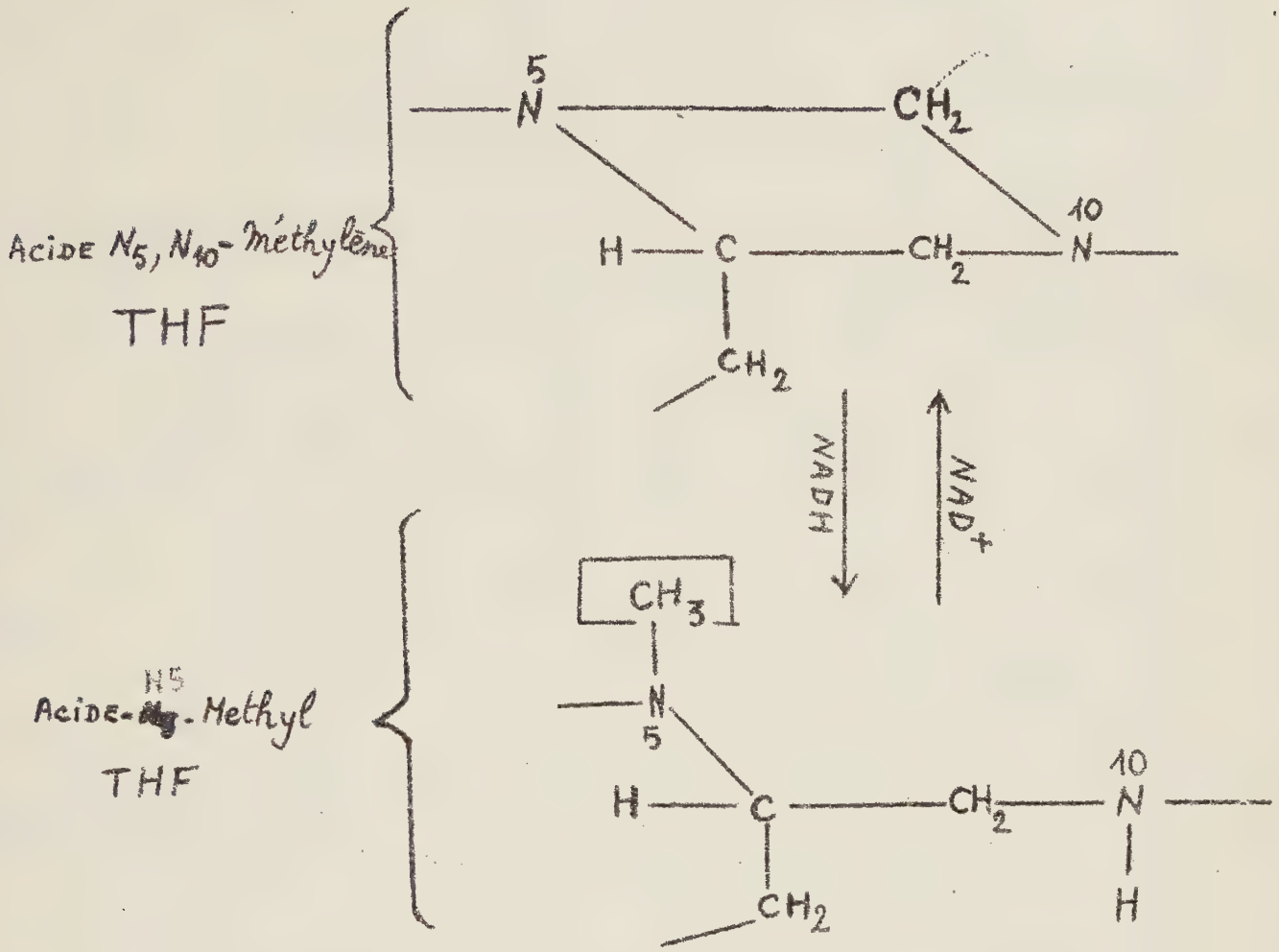


FIGURE 6 - REDUCTION DES RADICAUX MONOCARBONES.

Le passage de N_5,N_{10} _Methylene-THF vers la formeN5-Methyl-THF necessite la p

de NADH qui se transforme en NAD^+ lors de la réaction.

MECANISME D'ACTION DE L'ACIDE FOLIQUE

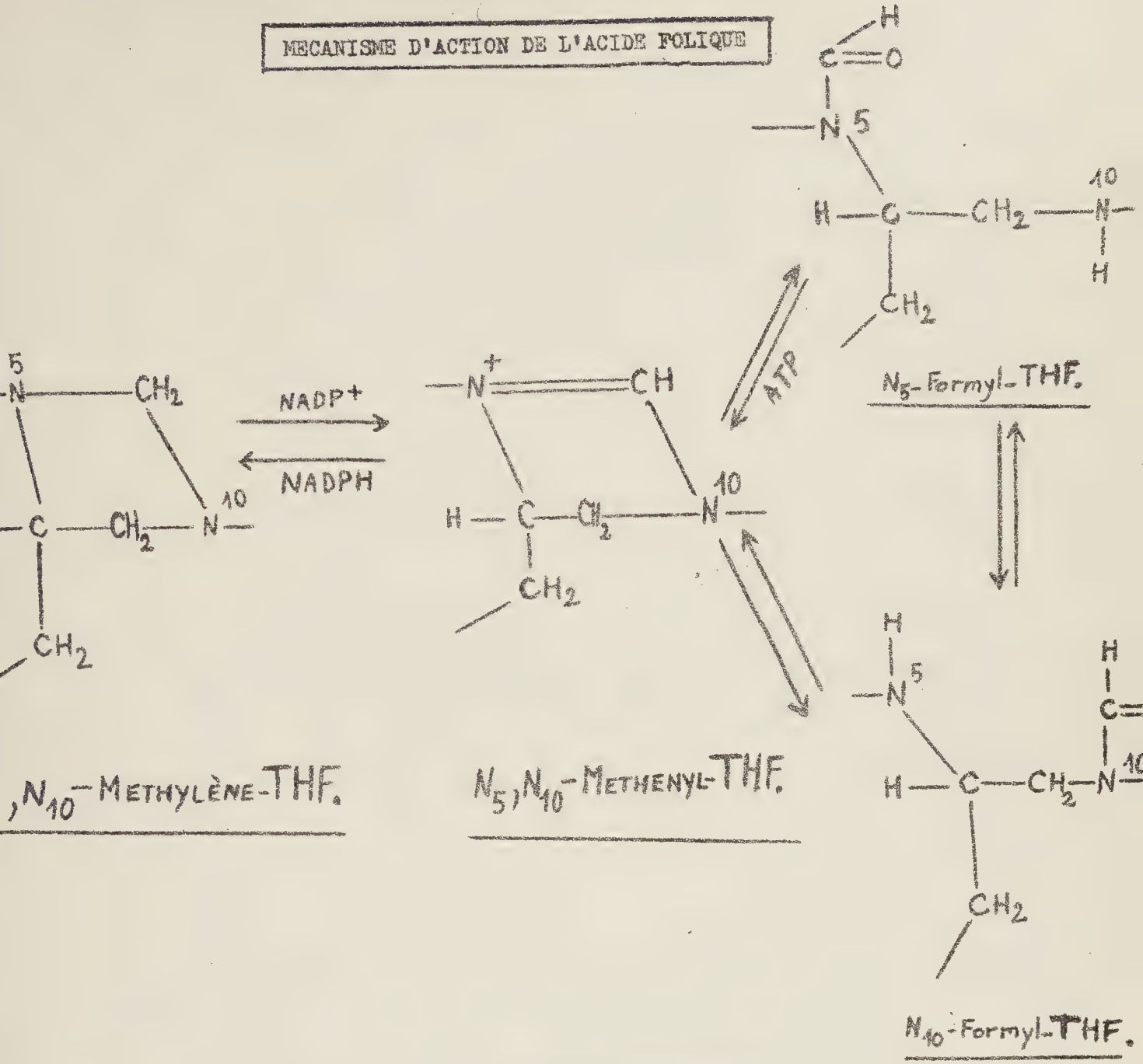


FIGURE 7 - OXYDATION DES RADICAUX MONOCARBONES.

Dans un premier temps l'acide N_5,N_{10}-Methylene-THF se trasforme en acide N_5,N_{10}-metheny

sous l'action de $NADP^+$.

Dans un deuxieme temps l'acide N_5,N_{10}-Méthényl-THF se convertit soit en acide N_5-Formy

-THF en pr ésence d'ATP, Soit en acide N_{10}-Formyl-THF sans besoin d'ATP.

REMARQUE: Toutes les étapes sont réversibles.

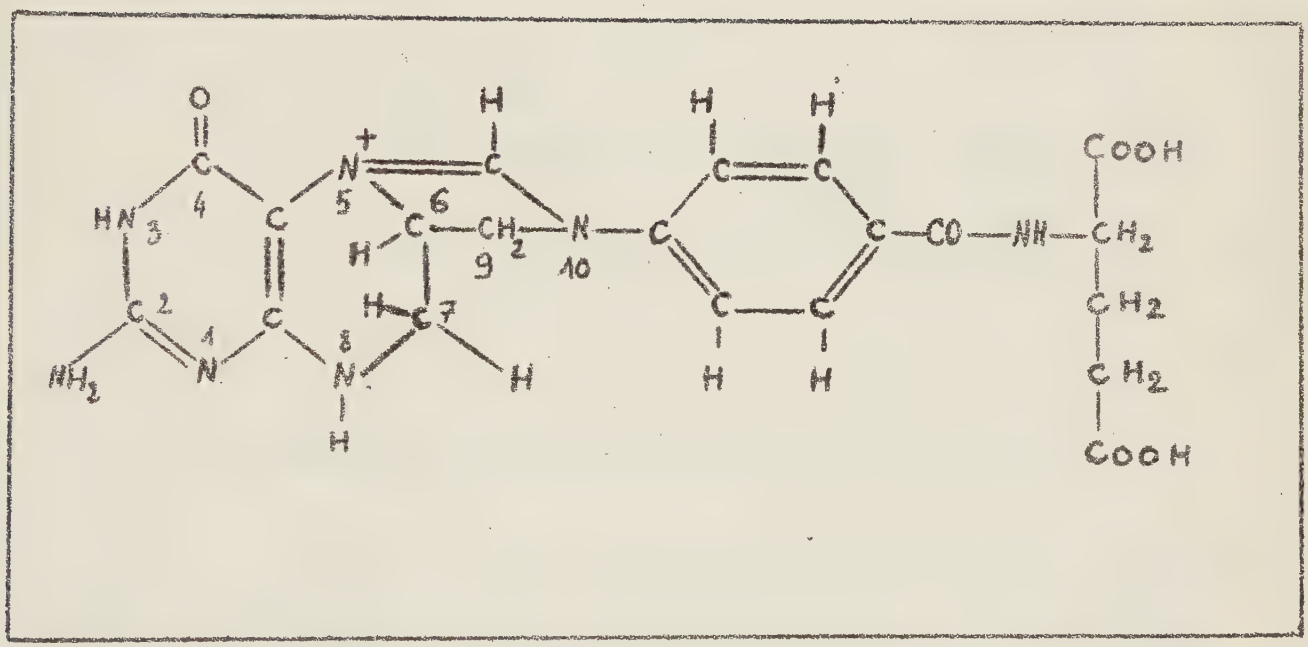


FIGURE 8 - ACIDE $N_{5'N^{10}}$-METHENYL-TETRAHYDROFOLIQUE.

2°) VITAMINE B 12 :

A - STRUCTURE

La structure de la vitamine B 12 est relativement complexe et n'est connue avec précision que depuis les travaux de LENHERT et HODKIN en 1961 (3). Ces auteurs utilisant la technique de cristallographie aux rayons X, ont décrit quatre composants essentiels de la forme coenzymatique la plus fréquente de la vitamine B 12 (figure 9) :

- Un noyau Corrine
- Un pseudonucléotide (dimethyl-5,6-benzimidazol-ribotide)
- Un désoxynucléoside (5'-désoxyadénosyl)
- Un ion cobalt.

a) Description du noyau Corrine (figure 9) :

Le noyau Corrine est formé de quatre cycles pyrroles désignés respectivement par les lettres (A, B, C, D). Ces cycles pyrroles sont unis entre eux par trois ponts méthènes : $(- \overset{H}{\overset{/}{C}} =)$ et une liaison simple du type Carbone-Carbone située entre les cycles A et D.

Le noyau Corrine comporte divers substituants situés sur les carbones externes des quatres cycles pyrroles (51).

- Huit radicaux Méthyles
- Trois radicaux Ethamides
- Trois propamides
- Un résidu propionyl.

b) Le résidu 5'désoxyadénosyl :

Il est relié au noyau Corrine par une liaison de coordinence située entre les carbones 5' du ribose et l'atome de Cobalt. Ce dernier peut adopter des degrés d'oxydation variables en fonction de la forme coenzymatique de la vitamine B 12 où il intervient. C'est à la liaison carbone 5'-Cobalt qu'est attribuée l'activité essentielle de la vitamine B 12 (64).

c) Description du pseudonucléotide :

Le diméthyl-5,6-benzimidazol-ribotide est composé d'un ribose phosphrylé sur le carbone ($C^{3'}$) et d'une base particulière (5,6-benzimidazol-) enfin, le phosphate situé en 3' est estérifié par la fonction alcool d'un résidu amino-propanol. La liaison entre ce pseudo-nucléotide et le noyau Corrine est une liaison amide qui se forme par condensation de l'Hydrogène de la fonction amine (-NH2) de l'aminopropanol du pseudonucléotide et le résidu propionyl subsituant du cycle D

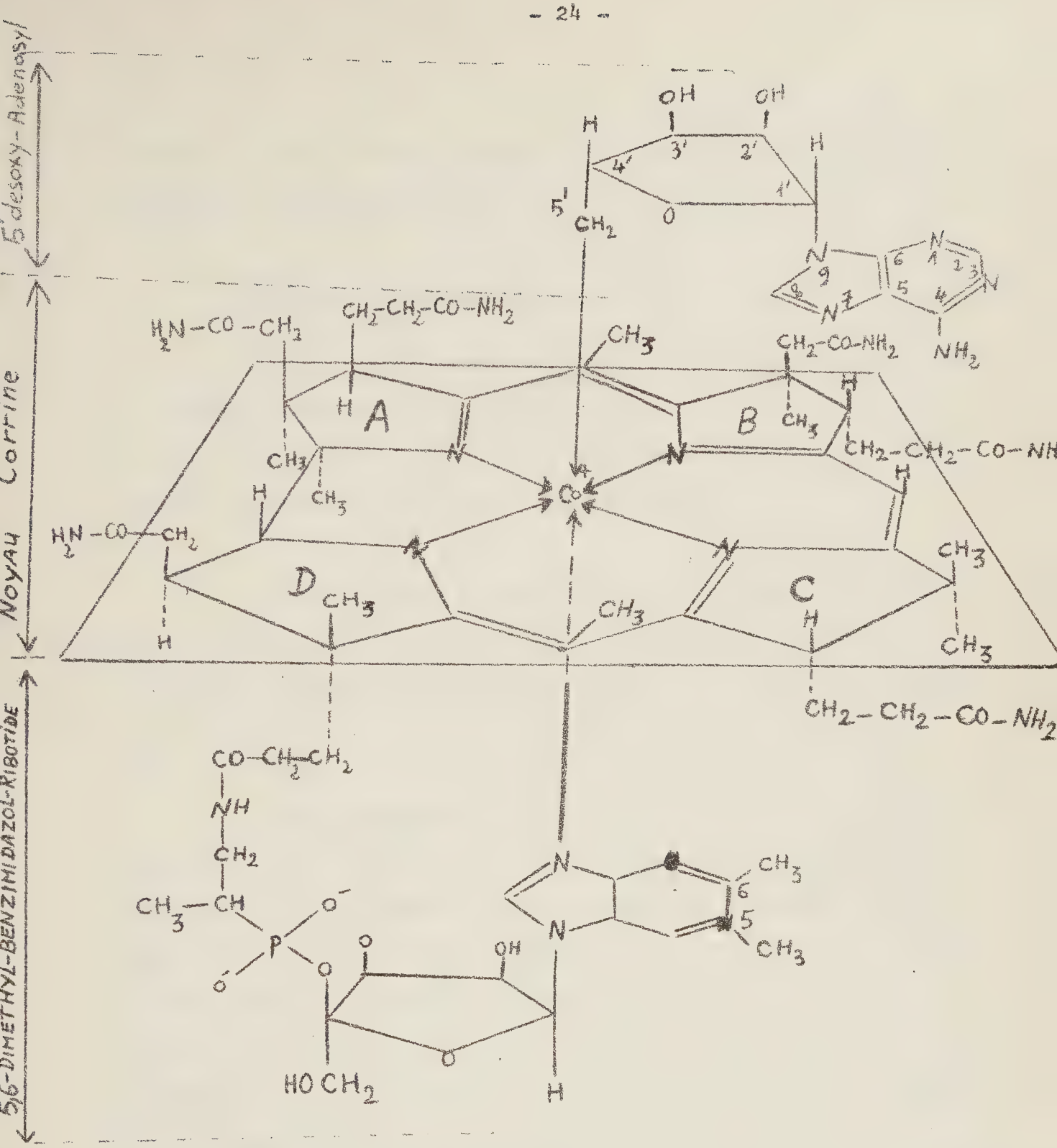


FIGURE 9 - 5'DESOXYADENOSYL-B_{12}

REMARQUE: C'EST LA FORME COENZYMATIQUE LA PLUS FREQUENTE DE LA VITAMINE B_{12}

du noyau Corrine. Enfin, l'azote libre de la base échange une liaison de coordinence avec l'ion cobalt central.

d) Rôle de l'ion cobalt :

L'ion cobalt central assure la cohésion de la molécule en échangeant six liaisons de coordinence d'une part avec les atomes d'azote des quatre cycles pyrroles et d'autre part, avec les deux substituants de type nucléotidique.

Ce ion cobalt occupe une place clef dans la structure de la vitamine B 12 et joue un rôle de premier plan dans les réactions métaboliques dans lesquelles cette vitamine est requise, en subissant tour à tour des phénomènes d'oxydo-réduction.

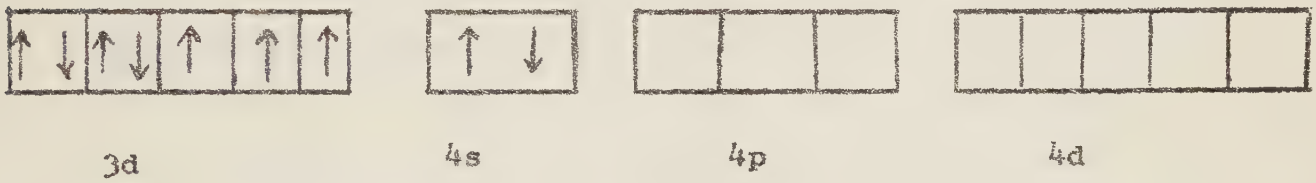
Une compréhension claire des réactions d'oxydo-réduction attribuées à la vitamine B 12 (60) exige une connaissance approfondie de la structure électronique de l'élément cobalt (*). Dans son état fondamental (figure 10), l'atome de cobalt possède la structure électronique suivante (43) :

COUCHES	K (1)	L (2)		M (3)			N (4)			
SOUS-COUCHES	1s	2s	2p	3s	3p	3d	4s	4d	4d	4f
NOMBRE D'ELECTRONS	2	2	6	2	6	7	2			

(COUCHES ELECTRONIQUES SUPERFICIELLES DU COBALT)

(*) Une étude approfondie de la structure électronique de la vitamine B 12, effectuée par la méthode des orbitales moléçulaires, a montré que le système corrinoide-Ligands est très bon accepteur d'électrons (travaux de VEILLARD A et al) (60).

On peut représenter plus simplement cet état fondamental du cobalt en figurant les électrons par des flèches orientées vers le bas ou vers le haut selon que leur spin est négatif ou positif (figure 11). Par case quantique il ne peut y avoir au maximum que deux électrons :



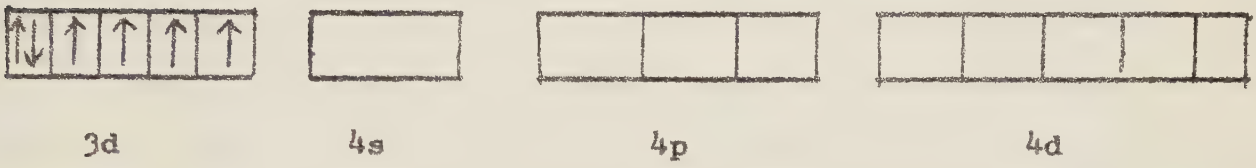
Cette façon d'écrire la formule électronique de cobalt est pratique car elle facilite la lecture des formes ionisées de cet élement.

En effet, les possibilités d'ionisation du cobalt sont :
(-1,0,+*,+2,+3,+4,+5)
selon que cet atome gagne un électron ou en perd 1,2,3,4 voire 5 (43).

Dans la vitamine B12, l'atome de cobalt a moins de possibilités d'ionisation ; celles-ci se résument aux pertes de 1,2 ou 3 électrons. Les composés vitaminiques qui leur correspondent sont par conséquent monovalent (Co^{+}), divalents (Co^{++}), ou trivalents (Co^{+++}).

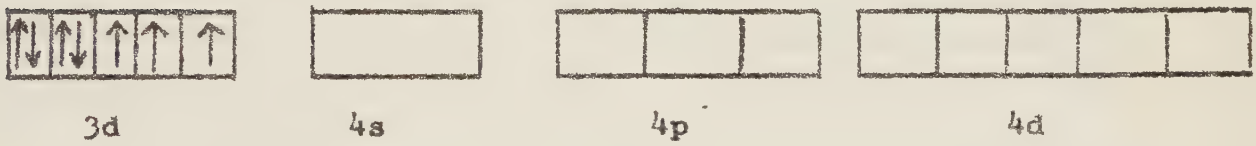
Dans certains composés vitaminiques l'ion cobalt peut être trivalent et possède alors une structure électronique où on ne retrouve plus les deux électrons 4s ni un des électrons 3d initialement présents dans l'état fondamental (figure 12) :

- FIGURE 12 -



Dans le cas du composé vitaminique divalent (B12r), l'ion cobalt ne perd que les deux électrons 4s et sa structure électronique se représente comme suit : (figure 13) :

- FIGURE 13 -



Enfin, dans le cas du composé vitaminique (B 12s), l'ion cobalt (figure 14) est monovalent et peut être figuré de la manière suivante :

- FIGURE 14 -

Dans la vitamine B12, les états ioniques : Co^{+}, Co^{++}, Co^{+++} sont stabilisés par la présence de coordinats convenables (43). Les coordinats (ou ligands) sont reliés à l'ion cobalt par six liaisons de coordinence dont quatre sont fournies par des doublets electroniques appartenant initialement aux atomes d'azote des quatre cycles pyrroles et deux d'entre elles, sont destinées l'une, aux diméthyl-5,6-benzymidazol-ribotide et l'autre, au 5'désoxy-adénosyl.

Dans la vitamine B 12, l'ion cobalt a la possibilité de passer de l'état Co^{+++} à l'état Co^{++} ou même à l'état Co^{+} sans que la structure héxacoordonée de cette vitamine soit modifiée (43).

B - MECANISME D'ACTION

Depuis que BARKER a clairement établi en 1960 la participation de la vitamine B 12 dans un certain nombre de réactions chimiques chez les bactéries et chez les animaux supérieurs, un grand intérêt s'est manifesté pour les dérivés Alkylés de cette vitamine et plus particulièrement pour le 5'désoxyadénosyl-B12.

Ces dérivés de la vitamine B 12 sont métaboliquement actifs en tant que coenzymes (3).

C'est au niveau du lien axial carbone-cobalt que se situe le point "chaud" de l'action coenzymatique de ces structures vitaminiques (4) (61) (17).

Les études de synthèse et de clivage de ce lien carbone-cobalt qui permettent de mieux comprendre le mécanisme d'action de

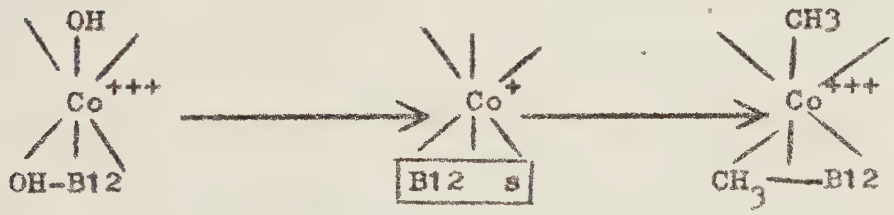
ces structures, ont été étudiées de façon chimique et enzymatique.

a) Etudes chimiques

. Synthèse du lien Carbone-Cobalt (54) (13) (Figure 15)

Sous certaines conditions de catalyse le dérivé hydroxy-B 12 qui possède un ion cobalt trivalent peut gagner deux électrons et se transforme alors en un produit voisin le B12s ; celui-ci présente de fortes propriétés nucléophiles et la présence d'un agent alkylant tel que (CH_3I) lui offre la possibilité de fixer un radical méthyle qui se lie à l'ion cobalt par une liaison de coordinence (C- Co) synthétisée de novo. On peut représenter schématiquement cette synthèse de la manière suivante (figure 15)

- FIGURE 15 -

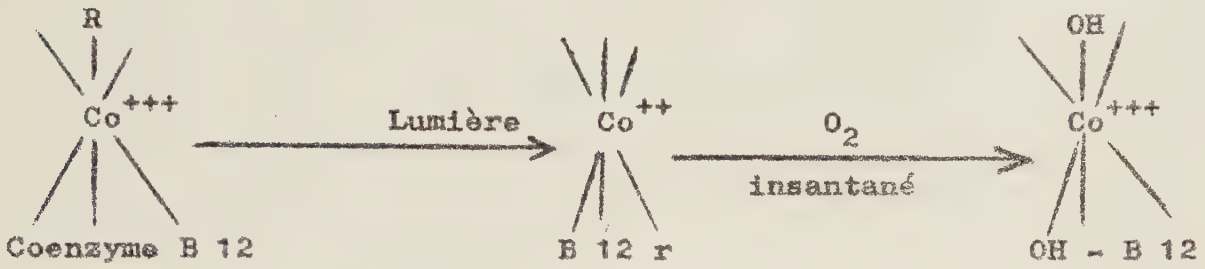


. Clivage du lien carbone-cobalt (17) (21) (18)

Le coenzyme-B12 subit en anaérobiose et sous l'action de la lumière une réduction simple de l'ion trivalent faisant partie de sa structure ; en même temps, il se produit la rupture du lien axial (C-Co).

Sous l'action de l'oxygène, le B12r (produit de réduction du coenzyme B12) se transforme instantanément en hydroxy-B 12 (figure 16)

- FIGURE 16 -

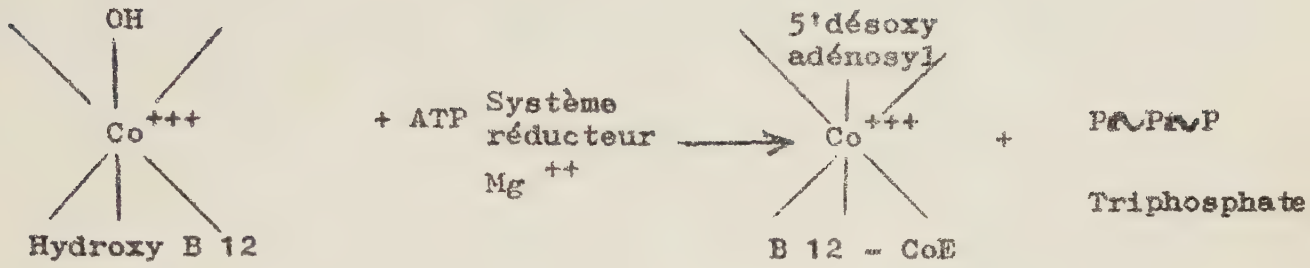


b) Réactions enzymatiques

La synthèse du lien carbone-cobalt de façon enzymatique est presque analogue à la synthèse chimique.

Par exemple, la synthèse du coenzyme B 12 qui est catalysée par des extraits de propiano-bactérium-Shermanii (BRADY 1962) (18) et des extraits de clostridium tétanomorphum (WEISSBACH 1961) (52) (PETER KOFSKY et WEISSBACH 1963) nécessite en même temps un système réducteur (acide lipoïque, thioprotéine, thioredoxeine) et l'ATP, ce dernier fournissant le substituant 5'désoxyadénosyl du coenzyme B 12 (figure 17).

- FIGURE 17 -



Les figures 15, 16 et 17 illustrent bien la manière dont s'effectue la synthèse et le clivage du lien carbone cobalt dans la vitamine B12. Dans les réactions métaboliques faisant intervenir la vitamine B 12 c'est précisément ce lien axial qui est sollicité. Pour expliquer le fonctionnement de cette vitamine on peut à titre d'exemple montrer son action dans le transfert d'hydrogène ou de radicaux méthyles :

. Cas du transfert d'hydrogène

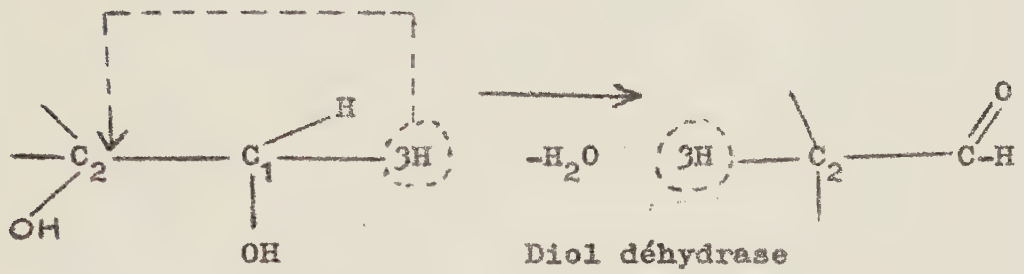
- Ce transfert peut être intramoléculaire comme il en est pour la réaction catalysée par la diol déhydrase dont le coenzyme est le 5'désoxyadénosyl B12. (1).

La dioldéhydrase va par l'intermédiaire de son 5'désoxyadénosyl B 12 permettre le transfert de l'hydrogène du Carbone C_1 au Carbone adjacent C_2 (19) - En même temps, une molécule d'eau se forme et on obtient le produit qui est un

aldéhyde.

La mise en évidence de ce transfert a pu être faite à l'aide d'un marquage du C_1 (Carbone Un) par le Tritium (figure 18) :

- FIGURE 18 -



DIOL ALDEHYDE

Le 5'-désoxyadénosyl B 12 ou DBCC intervient de la manière suivante dans le transfert d'hydrogène, (25) (figure 19)

- FIGURE 19 -

1° étape S 3_H + E + DBCC ⟶ S. E. DBCC. 3_H

2° étape S. E. DBCC. 3_H ⟶ E + DBCC + P-3_H + H_2O.

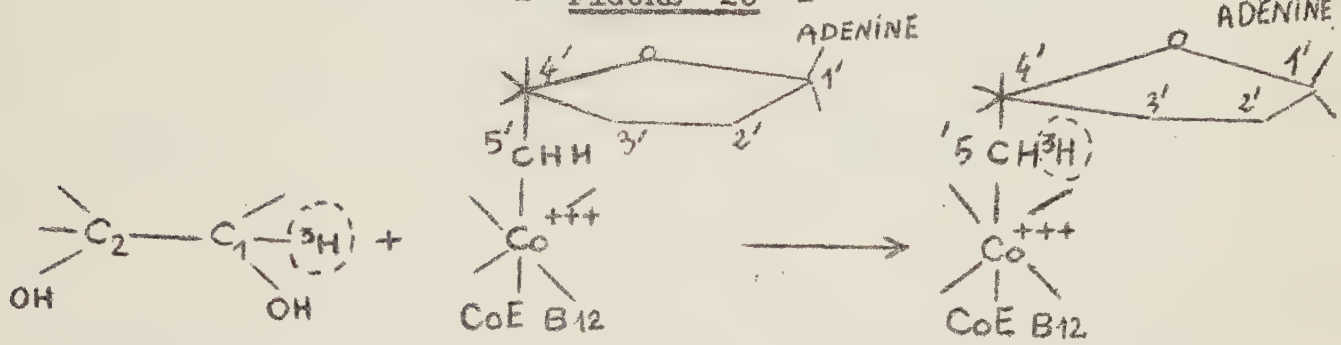
S—— H^3 substrat marqué par un tritium 3_H

E Enzyme

DBCC Coenzyme B_{12} ou Dimethyl 5,6 benzimidazol - Coenzyme Cobamide.

La première étape se caractérise par la formation du complexe substrat - enzyme - coenzyme marqué sur son carbone 5' par l'hydrogène tritié prélevé sur le substrat Diol (figure 20)

- FIGURE 20 -



Dans la deuxième étape l'hydrogène tritié est cédé par le DBCC H^3 au produit (Aldéhyde) P—^{3}H.

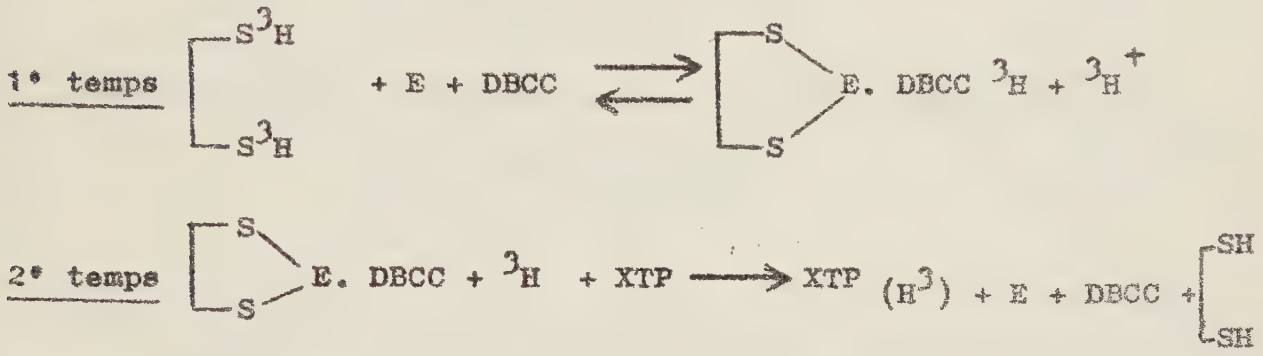
- Le transfert d'hydrogène peut être intermoléculaire : (figure 21)

Il en est ainsi lorsqu'il s'agit de réaction catalysée par la ribonucléotide réductase.

Contrairement à la réaction de la dioldéhydrase où ^3H est prélevé du carbone C_1 par le DBCC qui le positionne en second lieu sur le carbone C_2 du même composé, le DBCC de la ribonucléotide réductase (28) va prélever l'hydrogène tritié soit à partir du réducteur principal qui se trouve dans le milieu

(dihydrolipoate) puis dans un deuxième temps il le transfert sur le carbone 2' du substrat (un nucléoside triphosphate ATP, GTP, CTP ou UTP). Le nucléoside est réduit par substitution d'un hydrogène porté par le DBCC au radical OH situé sur le carbone C'2 du ribose.

- FIGURE 21 -



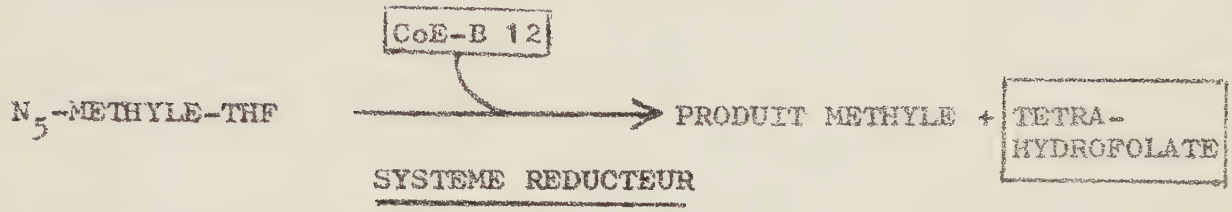
Cette réaction est une étape très importante dans la bioxynthèse du DNA chez les microorganismes et dans certaines cellules animales.

. Cas du transfert des radicaux méthyles :

On trouve des réactions qui conduisent à un transfert de radicaux méthyles au cours de la synthèse de la méthionine, du méthane et de l'acétate chez les microorganismes ; toutes ces réactions nécessitent la présence d'un coenzyme à cobamide.
Ce coenzyme à cobamide est solidaire d'une protéine apoenzymatique. Lors des réactions de transmethylation, ce complexe apoenzyme - coenzyme prélève un radical méthyle à partir d'un donneur adéquat, et le transfert sur un accepteur approprié. Dans les réactions de transmethylation qui font intervenir la vitamine B 12, le

pourvoyeur habituel en radicaux méthyles est le N5-Méthyle-THF. Ce type de réaction de transméthylation peut être schématisé de la manière suivante (figure 22) :

- FIGURE 22 -



Le transport du radical méthyle se fait par liaison directe de ce radical avec le cobalt central du coenzyme B 12 ; le Méthyle-B 12 ainsi obtenu, sert de forme intermédiaire dans la réaction et donc disparait une fois celle-ci achevée.

Pour illustrer le mécanisme d'action du coenzyme cobamide dans le cas des réactions de transméthylation qui occupent une place centrale dans les processus de synthèse du DNA, nous prenons en exemple la bioxynthèse de la Méthionine car cet acide aminé a un rôle à jouer dans la production du DNA et dans la division cellulaire.

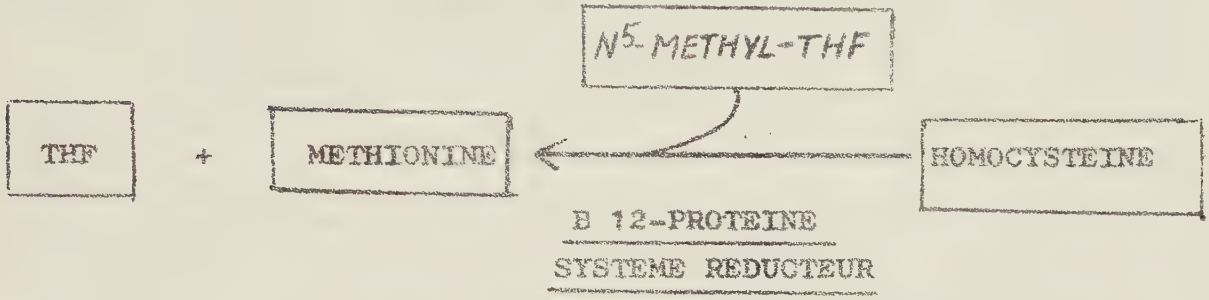
. Synthèse de la Méthionine

Ce type de réaction a été plus particulièrement étudié chez E. COLI. La méthionine est obtenue à partir de l'homocystéine qui est méthylée par le N5-MET-THF en présence de B12-PROTEINE-SYSTEME-REDUCTEUR. Cette réaction permet en outre l'obtention de

de tétrahydrofolate libre produit d'une grande importance dans le cycle des folates comme nous le verrons par la suite.

La réaction globale de la synthèse de la méthionine peut s'écrire de la façon suivante (figure 23) :

- FIGURE 23 -



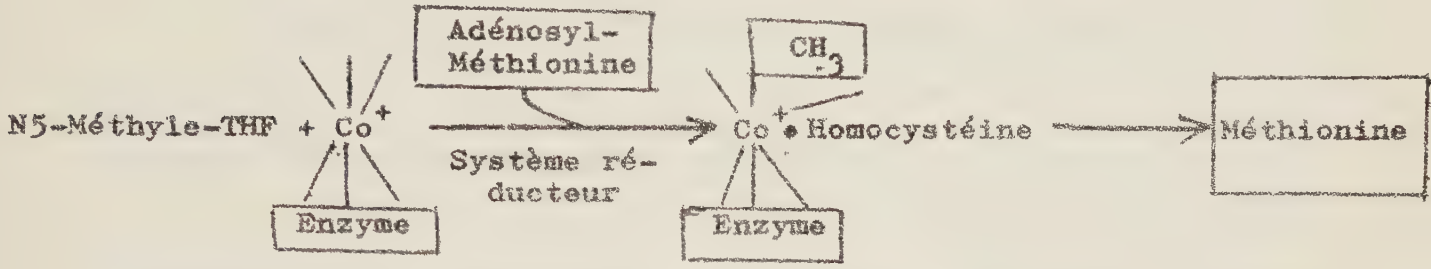
En fait, pour qu'une telle réaction ait lieu, la présence d'adénosyl-méthionine est indispensable de même que celle d'un système réducteur approprié. Le rôle de l'adénosyl-méthionine serait celui d'unamorceur de la réaction c'est à dire qu'il fournit les premiers radicaux méthyles en attendant que le système B12 prenne le relais. (GUEST, MAGUIN, FORSH - 1962) (32) (33) (56).

La réaction qui permet le passage de l'homocystéine vers la méthionine se fait en quelque sorte en deux étapes (56) :

L'acide folique méthyle le cobamide réduit (B12r) lié à l'enzyme pour en faire un méthyl-B 12 et lui se transforme en THF libre.

Le deuxième temps de la réaction consiste en un transfert du radical méthyle sur l'homocystéine qui se transforme alors en méthionine comme l'indique la figure 24, suivante (55) (56) :

- FIGURE 24 -



Le coenzyme B12 grâce à l'action de l'adénosyl-méthionine devient suffisament nucléophile et se met à son tour à accepter les radicaux méthyles pour les céder ultérieurement à l'homocystéine et remplace alors l'adénosyl-méthionine.

IV - ROLE DE LA VITAMINE B 12 ET DE L'ACIDE FOLIQUE DANS LA BIOSYNTHESE DU DNA ET DANS LA DIVISION CELLULAIRE

1°) INTRODUCTION :

Parmi les voies métaboliques qui aboutissent à la synthèse du DNA, la plus importante est celle où interviennent à la fois la ribonucléotide-réductase et la thymidilate synthétase ; (51).

S'il a pu être démontré que les Coenzymes foliques sont indispensables à l'action de la thymidilate synthétase, la dépendance de la Ribonucléotide-réductase par rapport aux Cobamides-Coenzymes n'est pas toujours prouvée dans le règne animal.

Ce sont des travaux consacrés à la pathogénie des anémies mégaloblastiques et parmi elles, l'anémie pernicieuse, qui ont motivé les recherches sur la ribonucléotide-réductase des différentes lignées cellulaires.

Cependant, les difficultés d'étude de la carence en vitamine B 12 ou en acide folique chez l'animal et les problèmes posés par les cultures de moëlle osseuse ont conduit de nombreux auteurs à chercher des "modèles" de mégaloblastes (11) en utilisant certains microorganismes. En effet, un déficit en vitamine B 12 dans les milieux de culture provoque des accroissements de taille comparables sur des cellules telles que Lactobacillus-Leischmanii ou Eugléna-gracilis ; ainsi a pu être étudié le déficit en vitamine B 12 dans des conditions bien définies. En outre, l'étude des systèmes enxymatiques de synthèse des désoxyribonucléotides, substrats de la synthèse du DNA à partir des ribonucléotides a été surtout poursuivie

sur des bactéries. Une étude plus récente (14) effectuée sur une algue unicellulaire (Eugléna-Gracilis Z) apporte des éléments nouveaux au problème du déficit en vitamine B 12.

2°) CAS DES SYSTEMES BACTERIENS :

a) Etudes effectuées sur la Ribonucléotide-Réductase :

- Les études ont surtout porté sur la Ribonucléotide-Réductase de deux espèces :

. Escherichia Coli et Lactobacillus-Leishmanii

La Ribonucléotide-Réductase d'Escherichia Coli utilise comme substrat préférentiel pour la Biosynthèse du DNA des Ribonucléosides diphosphates alors que celle de Lactobacillus-Leishmanii métabolise habituellement des ribonucléosides triphosphates (W.S. BECK 1968) (12).

Par ailleurs, il convient de remarquer que ces deux systèmes enzymatiques différents en ce qui concerne l'utilisation du Cofacteur B 12 (DBCC). En effet, la Ribonucléotide-Réductase de Lactobacillus-Leishmanii exige de manière absolue le DBCC alors que celle d'Escherichia Coli (W.S. BECK 1968) (12) peut s'en passer.

- Preuves de la dépendance de la Ribonucléotide-Réductase de Lactobacillus-Leishmanii vis à vis du DBCC :

Les expériences ont été faites in-vitro sur des cellules entières et des extraits bruts de bactéries. De ces

expériences, il ressort que la vitamine B 12 participe à la réduction des ribonucléotides dans Lactobacillus-Leishmanii en substituant le radical hydroxyl du Carbone 3' du ribose par un atome d'Hydrogène.

Quatre sortes d'arguments indirects le prouvent :

* La vitamine B 12 sous sa forme Coenzymatique (DBCC) est indispensable à l'action de la Ribonucléotide-Réductase de Lactobacillus-Leishmanii si le substrat à réduire est constitué de Ribonucléosides diphosphates ou de désoxyribose libre c'est-à-dire non phosphaté (33).Par contre, elle n'est pas nécessaire si le substrat à transformer est formé de désoxy-ribonucléosides diphosphates.

* Des études isotopiques montrent que la conversion des groupements ribosyls en groupements désoxyribosyls est faible en cas de déficience du milieu en vitamine B 12. (22)

* Le taux des composés désoxyribosyls acido-solubles qui est très faible dans les cellules déficientes en vitamine B 12 est suivi d'un accroissement brusque et important si on apporte au milieu un excès en vitamine B 12 (6) (29).

* Enfin, quand Lactobacillus-Leishmanii est cultivé sur milieu privé de vitamine B 12, sa croissance s'effectue de façon désiquilibrée :

. Croissance filamenteuse du bacille
. Rapport RNA/DNA augmenté
. Division cellulaire bloquée (7) (8).

Un argument direct vient renforcer les preuves de la Cobamido-dépendance de la Ribonucléotide-Réductase de Lactobacillus-Leishmanii (10).

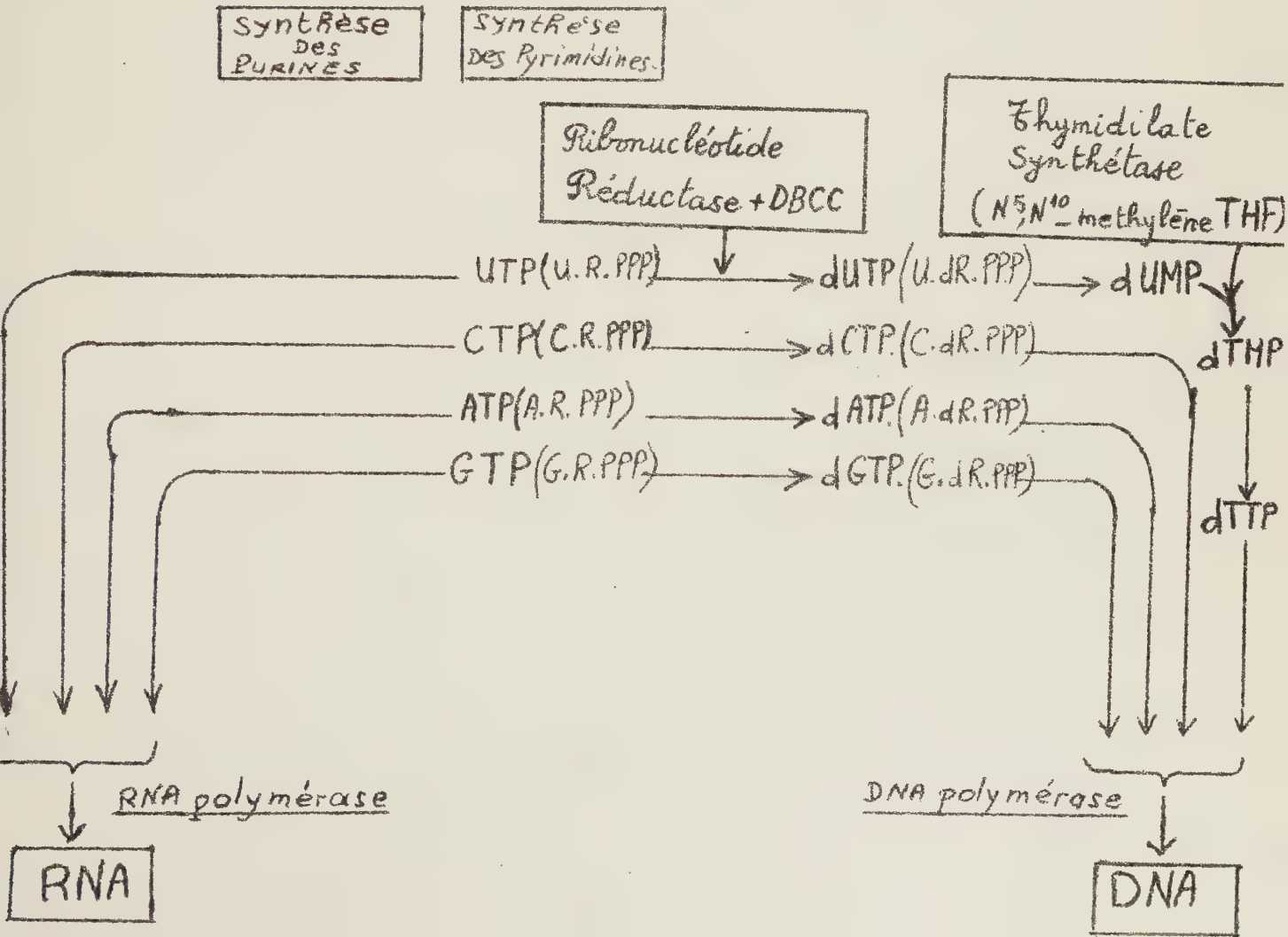
Cet argument direct est apporté par Blakley et Barker (1968) (15). Ces deux auteurs ont observé que le taux de conversion de la Cytidine-Mono-Phosphate (CMP) en Désocycitidine-Mono-Phosphate (dCMP) faible avec des extraits bruts de Lactobacillus-Leishmanii peut augmenter rapidement lorsqu'on ajoute au milieu le DBCC et un système réducteur (2 mercapto-éthanol plus un régénérateur de $NADPH^{+}$) (15) (9).

La réduction de la Cytidine-Diphosphate (CDP) dans les extraits de Lactobacillus Leishmanii dépend totalement, elle, de la Cyano-Cobalamine ajoutés. Cette activité double lorsque la Cyano-Cobalamine est remplacée par le DBCC. L'ATP est un réducteur dithiol sont également nécessaires ; par contre, il n'a pas été possible de mettre en évidence la nécessité absolue des ions Mg^{++}. Le substrat préférentiel est un nucléoside triphosphate (2) (29 bis). La réduction du substrat est liée Stoechiométriquement à la réduction d'un dithiol ou d'un autre composé portant une fonction thiol. Cette dépendance de la Ribonucléotide-Réductase vis à vis du DBCC n'est pas retrouvée chez Eschérichia Coli.

b) <u>Sites d'intervention de la Ribonucléotide-Réductase et de la Thymidilate Synthétase dans la Biosynthèse du DNA</u> :

L'action catalytique de la Ribonucléotide-Réductase et de la Thymidilate Synthétase dans la bioxynthèse du DNA peut être schématisée de la façon suivante : (figure 25)

- FIGURE 25 -



Dans la figure (25), on remarque que la réduction des substrats UTP, CTP, ATP et GTP en dUTP, dCTP, dATP et dGTP soit en désoxy-ribonucléosides triphosphates correspondants est dirigée par la ribonucléotide-réductase cobamido-dépendante.

Le dUTP subit en outre une déphosphorylation par une désoxy-UTP-pyrophosphatase et se transforme en dUMP. Ce dernier produit est méthylé en dTMP en présence de N^5, N^{10}-Méthylène-Tétrahydrofolate, qui est le donneur de méthyl, puis rephosphorylé en dTTP par des nucléotides Kinases. Nous y reviendrons.

Quoi qu'il en soit, c'est à partir de ces quatre désoxyribonucléosides-triphosphates que la DNA polymérase va pouvoir synthétiser le DNA.

c) <u>Contrôle génétique de la synthèse des précurseurs du DNA</u> :

La formation de DNA à partir des ribonucléotides sous l'action de la ribonucléotide-réductase est sous le contrôle direct d'un système represseur (10) qui régule l'activité enzymatique. On a pu montrer son existence et son efficacité en cultivant Lactobacillus-Leishmanii sur milieu contenant de la Thymine puis en privant brusquement ce microorganisme de ce composé (28). Ainsi, il se produit une augmentation de l'activité enzymatique et la Thymine agit donc comme un corépresseur. Le composé qui réprime la réductase semble être en fait la dTTP (29). Le Chloramphenicol empêcherait l'augmentation de l'activité enzyma-

tique liée à la privation brusque en Thymine (29).

d) Propriétés de la Ribonucléotide-Réductase purifiée :

Des travaux consacrés à l'étude de la ribonucléotide-réductase purifiée provenant de Lactobacillus-Leishmanii ont montré que d'une part, cette enzyme purifiée a les mêmes propriétés que la réductase brute, mais nécessite cependant, pour être active, la présence d'une protéine de support: la Thiorédoxine. D'autre part, le DBCC est plus efficace en sa présence qu'en présence de la Réductase brute. Le DBCC ne peut pas être remplacé par ses analogues (cyano-cobalamine, méthyl-cobalamine, ou hydroxy-cobalamine).

e) Régulation allostérique de l'activité de la Ribonucléotide-Réductase :

Le dATP participe à la réduction du CTP en jouant le rôle d'un effectueur allostérique positif, autrement dit, il augmente le rendement du système enzymatique de la réductase. Ce mécanisme valable pour l'ATP, l'est également pour les autres ribonucléosides triphosphates (UTP, ATP, GTP) et leurs effectueurs allostériques correspondants sont respectivement le CTP, le GTP et le dTTP (29 bis)

f) Interrelations métaboliques entre folates et cobalamines dans la synthèse du DNA :

Des interrelations métaboliques entre folates et

et avitamine B 12 existent dans la synthèse de la méthionine à partir d'homocystéine et dans celle du dTMP à partir de l'UTP. Ces deux étapes dans la biosynthèse du DNA sont capitales.

. Biosynthèse de la Méthionine à partir de l'Homocystéine :

La biosynthèse de la méthionine à partir de l'homocystéine permet de récupérer l'acide tétrahydrofolique en partant de la forme méthylée de celui-ci qui est N^5-Méthyl-Tétrahydrofolate. Cette forme de l'acide folique constitue une véritable"plaque tournante" du métabolisme des radicaux méthyles. La réaction qui résume cette synthèse peut s'écrire de la façon suivante :

$$\text{Homocystéine} + N^5\ \text{Méthyl}\ FH_4 \xrightarrow[\text{(Adénosyl-Méthionine)}]{\text{Vit.B 12}} \text{Méthionine} + FH_4$$

La vitamine B 12 et l'Adénosyl-Méthionine sont indispensables à cette transformation.

La vitamine B 12 intervient pour prendre en charge le radical méthyl qu'elle cède ultérieurement à l'homocystéine. L'absence de vitamine B 12 bloque la réaction (Longlin et Al.1964) ( )

L'adénosyl-méthionine joue le rôle d'amorceur de la réaction.

. La transformation de l'UTP en dTMP :

La transformation de l'UTP en dTMP se fait sous l'action successive de la Ribonucléotide-Réductase en présence de DBCC, puis de la Thymidilate Synthétase en présence de N^5, N^{10}-Méthylène-THF. Ceci peut se schématiser comme suit :

α $\quad$ UTP $\xrightarrow[\text{DBCC}]{\text{Ribonucléotide Réductase}}$ dUTP (U.dR.PPP) $\longrightarrow$

β $\quad$ $\xrightarrow[\text{dUTP Pyrophosphatase}]{}$ dUMP $\xrightarrow[N^5,N^{10}\text{-Méthylène THF}]{\text{Thymidilate Synthétase}}$ dTMP

. Tableau récapitulatif des interrelations Folate-Cobalamines

Les interrelations Folates-Cobalamines vues précédemment peuvent être résumées sous forme d'un tableau (tableau n° 1). Ce tableau fait bien ressortir la place occupée par l'Acide Tétrahydrofolique libre.

TABLEAU N° 1

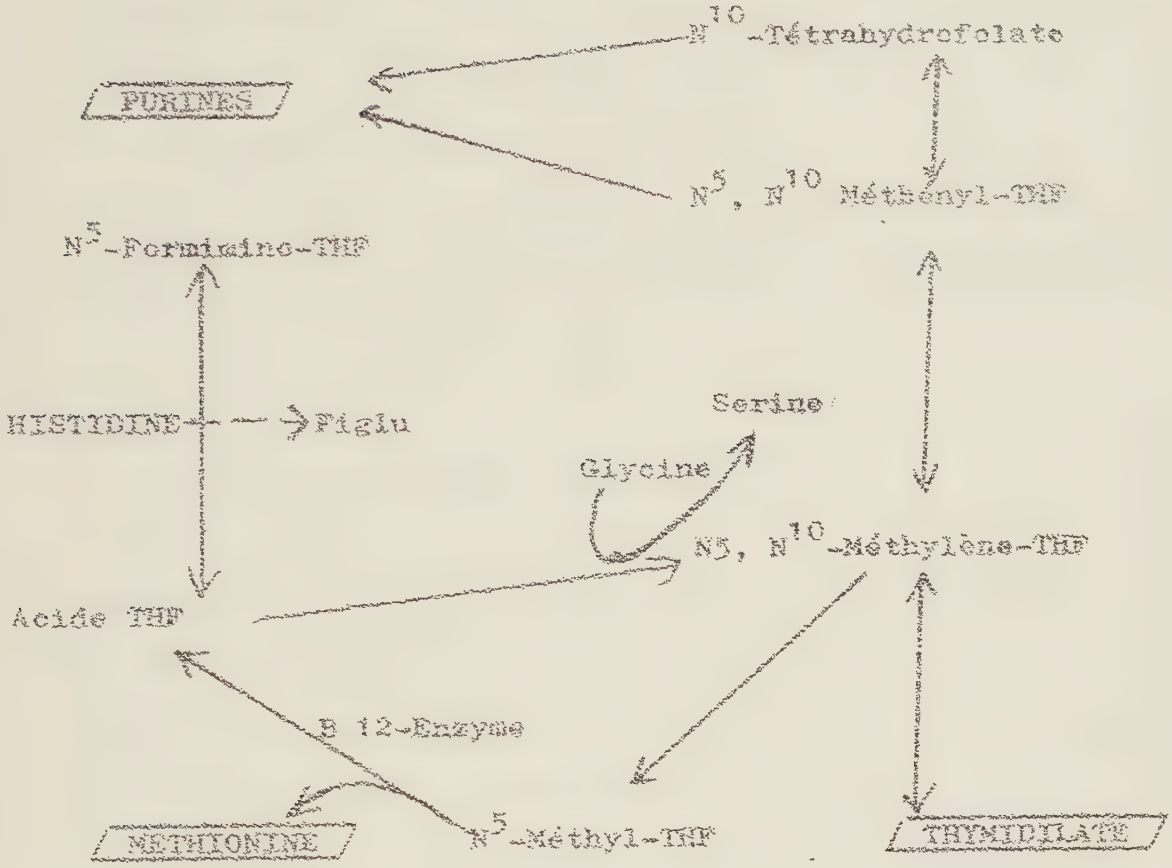


TABLEAU RECAPITULATIF DES INTERRELATIONS FOLATES-COBALAMINES

- DANS LA BIOSYNTHESE DE LA METHIONINE A PARTIR DE L'HOMO-CYSTEINE ET DU dTMP A PARTIR DE L'UTP.

3°) OBSERVATIONS EFFECTUEES SUR EUGLENAGRACILIS Z :

Deux types de malformations cytologiques ont été mises en évidence chez des cellules d'Euglénagracilis Z bloquées en carence vitaminique B 12. Ces malformations sont caractéristiques de deux étapes de la croissance des cultures :

La phase exponentielle et la phase stationnaire.

Les conséquences biochimiques de ce blocage sont différents dans ces deux stades où elles représentent respectivement une carence intense et une carence ménagée en vitamine B 12.

a) Carence en phase exponentielle :

La carence exponentielle où le taux de multiplication cellulaire est très important, se caractérise par l'accroissement très important du volume cellulaire. Celui-ci peut passer de 1000 Micro-cubes (volume normal) à 15000 Micro-cubes au quinzième jour de la carence. D'autre part, les rapports ARN/ADN et Protéines/ADN deviennent extrêmement déséquilibrés et passent respectivement de 8,1 à 36 et de 55 à 279 (VALENCIA 1974) (59 a).

b) Carence en phase stationnaire :

La carence en phase stationnaire ne présente pas de telles variations de volume (il double au maximum) et les résultats peuvent s'exprimer en fonction du temps et de l'origine de la carence. Les rapports ARN/ADN et protéines/ADN augmentent seulement de 50 % au douzième jour (VALENCIA 1974) (59 a).

c) Discussion :

Au cours des deux phases les teneurs en ARN et Protéines subissent des variations sensiblement parallèles et de ce fait, leur rapport n'est pas tellement modifié. Le déséquilibre du rapport ARN/ADN très augmenté est conforme à ce que l'on sait des cellules sanguines anormales de l'anémie pernicieuse (THORELL) (38) (MARINONE) (37) (45).

Si l'on rapporte cependant, le taux d'ARN et de Protéines à l'unité de volume (1000 Micro-Cubes) on constate que les protéines et l'ARN n'augmentent pas mais au contraire, diminuent curieusement de la même façon en phase exponentielle et stationnaire tandis qu'on note une baisse de la "densité" du DNA en phase stationnaire et son effondrement en phase exponentielle au quinzième jour. A ce stade de l'analyse, le phénomène essentiel de la carence en vitamine B 12 au niveau cellulaire paraît être la dissociation naturelle entre, d'une part, les synthèses d'ARN et de Protéines qui continuent de manière intense alors que d'autre part, la synthèse du DNA est relativement bloquée ; il y a donc, en fait, la poursuite de la transcription et de la traduction en l'absence de réplication normale du DNA.

4°) CAS DES CELLULES ANIMALES :

La problème posé par les anémies mégaloblastiques a conduit à étudier le mécanisme de l'intervention de la Vitamine B 12 et de l'acide folique dans les étapes de la biosynthèse du DNA dans les cellules d'organismes supérieurs, bien que les recherches effectuées dans ce domaine se soient heurtées à de plus grandes difficultés que dans le cas des microorganismes. Toutefois, des résultats ont été obtenus avec du matériel cellulaire provenant de différentes origines. Ainsi, chez le rat, il a été bien établi que les résidus désoxyriboses liés aux bases puriques ou pyrimidiques proviennent de ribonucléotides par réduction des groupements ribosyls sans qu'il y ait rupture de la liaison glycosidique (ROSE et SWOHEIGERT 1953) (53). Par ailleurs, REICHARD ET COLL (32) (1960) ont montré qu'in vitro des systèmes enzymatiques solubles extraits d'embryons de poulet sont capables de réduire les ribonucléotides.
Ce sont là quelques preuves de l'existence de la Ribonucléotide-Réductase. Nous allons considérer les résultats obtenus avec des tissus plus particulièrement étudiés.

a) HEPATOME DE NOVIKOFF :

La Ribonucléotide-Réductase de l'hépatome de Novikoff utilise de préférence les ribonucléosides diphosphates et montre un besoin absolu en réducteur dithiol et en ions Mg^{++}.

La réduction de CDP en dCMP en présence de la Ribonucléotide-Réductase est stimulée allostériquement par l'ATP et est par contre, inhibée par le dATP.

Cette Ribonucléotide-Réductase n'exige pas de DBCC ; ceci là rapproche de la Ribonucléotide-Réductase d'Escherichia Coli (MOOR et HURLBERT, 1966) (47).

b) ASCITE D'HERLICH :

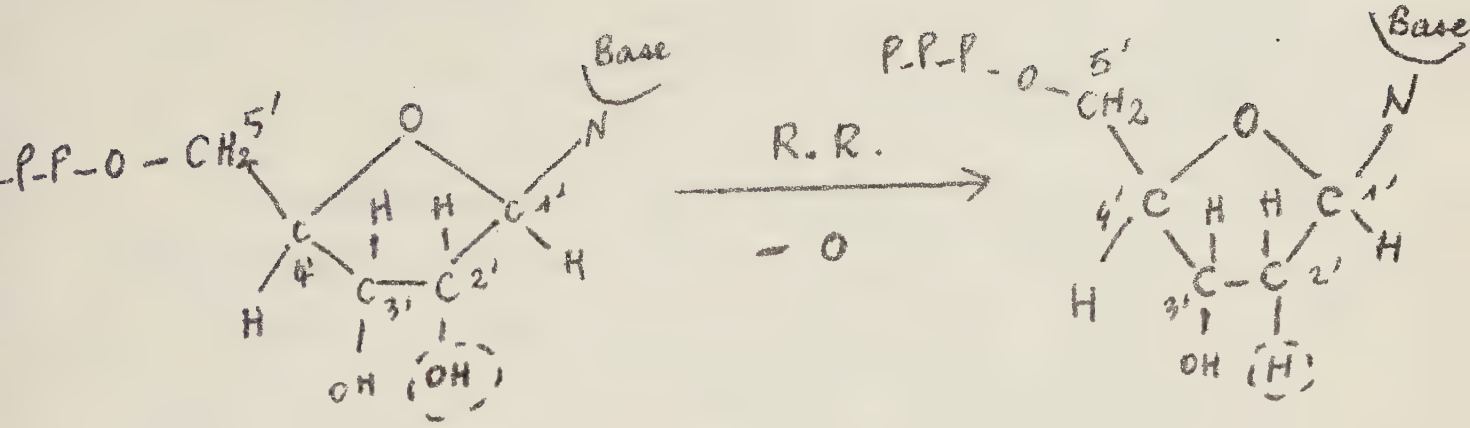
La Ribonucléotide-Réductase des cellules de l'Ascite d'Herlich est inhibée par la désoxy-adénosine. Cette propriété la rapproche davantage de la Ribonucléotide-Réductase de l'hépatome de Novikoff et d'Escherichia Coli que de la Ribonucléotide-Réductase de Lactobacillus Leishmanii.

Cependant, d'après (MUNCH-PETERSEN, 1960) (48) et (LARSSON et NEILANDS, 1966) (39), cette propriété de la Ribonucléotide-Réductase n'a pas été retrouvée dans d'autres lignées cellulaires.

c) FOIE DE RAT EN REGENERATION :

Le phosphore 32 et la Cytidine doublement marquée sont retrouvés dans les mêmes proportions dans le CMP du RNA et dans le dCMP du DNA. Ceci suggère que tous les désoxyribosyls proviennent d'une réduction des ribonucléotides par action d'une Ribonucléotide-Réductase dont on ne sait pas encore si elle est ou pas Cobamido-dépendante (figure 26).

- FIGURE 26 -



d) CAS PARTICULIER DES CELLULES DE LA MOELLE OSSEUSE :

Les effets thérapeutiques efficaces de la vitamine B 12 et de l'acide folique dans les anémies macrocytiques ont conduit à rechercher le rôle précis de ces deux facteurs dans les phénomènes de croissance et de multiplication des cellules de la moelle osseuse. Cependant, l'abord de ce problème n'a pu se faire que de manière indirecte. En effet, c'est par l'interprétation d'observations chimiques ou cytologiques que les différents auteurs ont formulé des hypothèses sur le mécanisme des perturbations biochimiques des anémies mégaloblastiques.

. Etude Cytologique :

Ces anémies se définissent sur le plan cytologique par la présence de mégaloblastes dont les principales caractéristiques sont :

* Une taille plus importante que la normale

* Un rapport cytoplasme/noyau élevé
* Une présence de granulations fines dans la chromatine
* Enfin, une basophilie des cellules les plus jeunes.

La moelle osseuse est habituellement riche en éléments cellulaires. Elle contient plus de cellules de la lignée rouge que de cellules de la lignée blanche. La plupart des cellules erythroïdes sont relativement immatures, présentent un index mitotique élevé ainsi que des images mitotiques anormales (hyper-segmentation des noyaux). La teneur en fer y est élevée.

La richesse de cette moelle en éléments cellulaires qui contraste avec la pauvreté du sang périphérique est une caractéristique à mettre en relation avec une érythropoïèse inefficace par suite de la mort massive des jeunes cellules avant leur passage dans la circulation sanguine. Les précurseurs des granulocytes révèlent des dismorphismes identiques à ceux des cellules rouges. Des altérations comparables atteignent d'autres cellules de l'organisme comme par exemple, les cellules à division relativement rapide de l'épithelium buccal et vaginal.

. Etude Biochimique :

Sur le plan biochimique les mégaloblastes se caractérisent par

* une augmentation du rapport $\frac{RNA}{DNA}$ (WHITE 1953) (GLAZER 1954) (65). Le taux élevé de RNA compte vraisemblablement pour beaucoup dans la basophilie du cytoplasme.

* la thymidine et la désoxyuridine sont incorporées activemen dans le DNA des mégaloblastes (THOMAS et LOCHTE 1958) (58) (LESSMER 1959 et FRIEDKIN) (41), ce qui prouve par conséquent, que la DNA polymérase

reste active.

* La thymidine ne peut pas, à elle seule, faire disparaître la mégaloblastose lors d'un déficit en vitamine B 12.

Ces résultats suggèrent que le mégaloblaste est dans un état de croissance désiquilibré et que c'est un défaut de duplication du DNA qui en serait la cause principale. Les autres perturbations $\frac{RNA}{DNA}$ augmenté, augmentation de la taille, basophilie découleraient de la cause première.

Cependant, si les anémies mégaloblastiques sont des ressemblances en ce qui concerne l'aspect morphologique des cellules, il en est autrement pour leur mécanisme pathogénique et des distinctions doivent être faites à ce sujet.

C'est ainsi que la mégaloblastose dûe à un déficit en folate praît liée (BECK 1965) (10) au défaut de la production de thymidilate dans les cellules de la moelle osseuse.

La mégaloblastose des anémies réfractaires au traitement par la vitamine B 12 mais sensible, à un apport massif des différents désoxyribonucléotides paraît liée à un manque de synthèse des enzymes nécessaires à la formation des désoxyribonucléotides. Des cloues cellulaires mutants en seraient responsables (KLUBERG et BECK 1968) (37).

Le problème de la mégaloblastose liée à une déficience en vitamine B 12 demeure toujours posé car les avis sont différents en ce qui concerne le rôle de la vitamine B 12.

* Pour BECK et HINRISCHEN (1968) (34), la ribonucléotide-réductase des cellules de la moelle osseuse serait cobamido-dépendante. Cette conclusion se base sur des expériences réalisées avec du DBCC marqué à l'hydrogène tritié. Si ceci s'avère vrai ; Lactobacillus Leishmanii déficient en vitamine B 12 pourra être utilisé comme "modèle mégaloblastique".

* Pour SEIKOKU FUJIOKA et ROBERT SILBER (1968) (26), la Ribonucléotide-réductase de la moelle osseuse est cobamido-indépendante comme celle d'Escherichia Coli. Ces auteurs ont utilisé des cellules en culture provenant de la moelle osseuse de malades atteints d'anémie pernicieuse donc par conséquent, sévèrement privées en vitamine B 12 et ont montré que la Ribonucléotide-Réductase de cette moelle nécessite pour son activité des nucléosides diphosphaté et un réducteur dithiol comme dans le cas pour Escherichia Coli.

De plus, cette enzyme n'est pas stimulée par l'addition au milieu de DBCC marqué (5'-désoxyadénosyl B 12). Ce qui a accentué cette ressemblance avec celle d'Escherichia Coli.

En outre, la Ribonucléotide-Réductase des cellules en culture de la moelle osseuse mégaloblastique est inhibée par l'hydroxyurée qui est considérée comme un inhibiteur spécifique de la réductase chez Escherichia Coli (KRAKOFF et Coll 1968) (38).

e) Observation effectuée sur les lymphocytes humains stimulés par une phyto-agglutinine :

Les lymphocytes humains mis en culture puis soumis à l'action stimulante de la phyto-agglutinine subissent une dédifférenciation et se comportent au point de vue de leurs nombreuses actions métaboliques comme des pronormoblastes (FARID HAURANI 1973) (23). Ces lymphocytes quand ils proviennent de malades atteints d'anémie pernicieuse ont une thymidilate-synthétase moins active que celle des lymphocytes appartenant à des sujets en rémission de cette maladie et à plus forte raison, celle des sujets normaux. Il n'est pas évident que l'action de la thymidilate-synthétase dépende de la présence de la vitamine B 12. A cet égard, il a été observé que des préparations purifiées de thymidilate-synthétase ne révèlent pas la présence de vitamine B 12. En outre, l'addition de cette dernière in vitro n'affecte en rien l'activité de la thymidilate-synthétase. Selon F.I. HAURANI, le rôle de la vitamine B 12 serait de contrôler la synthèse de la thymidilate-synthétase (51). Dans ces conditions, un défaut en vitamine B 12 entraînerait un manque de synthèse de l'enzyme et par conséquent bloquerait la production du DNA. Ceci aurait pour conséquence l'accumulation de N^5-Méthyl-Tétrahydrofolate et une sorte de "piège" à méthyle est réalisé.

5°) DISCUSSION :

L'analyse des études exposées au chapître précédent conduit à la conviction qu'il existe des liens étroits entre les actions métaboliques de l'acide folique et de la vitamine B 12 lors de la biosynthèse du DNA. Mais, l'existence de tels liens, qui traduisent une convergence d'action de ces deux facteurs, soulève le problème de savoir s'ils agissent :

- A un niveau différent d'un même processus métabolique, auquel cas l'absence de l'un ou de l'autre déclencherait le blocage de ce processus.

  ou bien

- Au même niveau, dans ce cas, plusieurs hypothèses sont possibles :

  . Soit que l'un des deux facteurs contrôle la biosynthèse de l'autre ou du moins l'active.

  . Soit que les actions métaboliques de l'un sont sous le contrôle de l'autre.

- En faveur de la première hypothèse on peut avancer les arguments suivants :

Le Coenzyme B 12, par la Ribonucléotide-Réductase-B 12-dépendante contrôle la conversion du ribose en désoxyribose dans les nucléotides, tandis qu'une des formes folates (N^5,N^{10}-Méthylène THF) commande la conversion de l'uridine en thymidine.

Comme la vitamine B 12 et l'acide folique participent à la biosynthèse des constituants du DNA, il suffirait de leur défaut à un niveau donné pour bloquer cette synthèse et par suite la division cellulaire.

Cependant, les choses ne sont pas aussi simples :
En effet, la ribonucléotide-Réductase-B 12-dépendante n'est pas retrouvée dans tous les cas ; bien qu'elle soit assez largement distribuée chez les microorganismes (VALENCIA 1974) (46), elle n'a été que rarement signalée dans les cellules animales.
Leucémie de souris (MANSON 1961) (44 a) (cité par R.VALENCIA) moelle osseuse (BECK 1968), (12).

Beaucoup d'autres auteurs indiquent que chez Escherichia Coli (W.BECK 1968) (12), dans l'ascite d'Ehrlich (BECK 1968) (12) dans l'hépatome de Novikoff (ELFORD 1968) (22 a) dans la rate de souris leucémique (FUJIOKA SILBERT 1970) (26 a), dans les cellules isolées de la moelle osseuse humaine de Biermériens (FUJIOKA et SILLER 1968) (26) il existe une ribonucléotide-Réductase agissant sur les nucléosides diphosphates et pour laquelle une cobamido-dépendance n'a pu être démontrée (VALENCIA 1974) (46), contrairement à ce qui se passe dans le cas de la Ribonucléotide-Réductase

de Lactobacillus-Leishmanii. Les études effectuées en particulier sur la moelle osseuse soulèvent le problème de la méthodologie employée à deux niveaux.

D'une part, FUJIOKA et SILBERT travaillent sur des cellules malades pour lesquelles on est en droit de se demander si justement une modification enzymatique n'est pas à l'origine de la maladie.

D'autre part, il pourrait s'agir d'une insuffisance de purification de l'enzyme ribonucléotide-réductase qui pourrait alors être saturée en Coenzyme B 12, ainsi que le remarque VALENCIA en 1974 (46).

Cette critique n'est pas valable dans le cas de cellules provenant de Biermériens, c'est-à-dire pratiquement carencées en vitamine B 12. D'ailleurs, l'addition de cobamides in-vitro n'a aucun effet sur la ribonucléotide-réductase, (FUJIOKA et SILBERT 1969, BARKER 1972) (4 a) cités par VALENCIA (1974) (46).
Ces arguments ne suffisent pas pour écarter la dépendance de la ribonucléotide-réductase vis à vis des cobamides.

- L'hypothèse selon laquelle la vitamine B 12 aurait <u>une influence directe dans la biosynthèse des formes folates</u> séduit de nombreux auteurs sans qu'ils aient pu apporter autre chose que des preuves indirectes (GARDINIER et SILVERMAN (1960) (26) b TANAKA 1956, WILL et Al. 1959) cités par VALENCIA 1974 (46).

La mise en évidence de l'influence indirecte de la vitamine B 12 sur l'activité métabolique des folates découle des premières observations relatives à l'accumulation de l'acide formimino-glutamique (FIGCU) excrété dans l'urine soit par défaut de folates, soit par défaut de vitamine B 12 (GARDINER et SILVERMAN 1960) cités par VALENCIA (1974) (46).Tous les travaux relatifs à l'excrétion des métabolites servant de donneur pour le N^5-Formimino-THF, en carence folique, ou en carence B 12 ont été analysés par BLAKLEY (1969) (16 a). Il existe une bonne convergence des résultats, tant en clinique humaine (LOHBY et COOPERMANN 1962, CHANARRIN 1964) (20 a) (cités par VALENCIA 1974) (46) qu'en expérimentation animale (STOKSTAD et Al. 1966 (54 b) VITALE et HEGSTED (1967), (cités par VALENCIA) (1974) (46).

. L'exemple de la méthionine montre clairement comment la vitamine B 12 contrôle les actions métaboliques des folates. En effet, additionnée au régime, la méthionine est capable d'augmenter dans le foie, la proportion des formes folates non méthylées, vraisemblablement par inhibition de la méthylène THF réductase (NOROHNA et SILVERMAN 1961, 1962) (49 b). Il s'en suit soit une diminution des folates libres du foie (KUTZBACH et Al.1967 (38 a) soit leur maintien au même niveau grâce aux réserves de polyglutamates (THENEN et STOKSTAD 1973) (56 a). D'ailleurs la méthionine est aussi capable de supprimer, ou presque, l'excrétion de l'acide formimino-glutamique (SPIVEY FOX et Al. 1961) (54 a). Toutes ces observations tendent à confirmer que la méthionine peut apporter un correctif à certains conséquences de la carence

en vitamine B 12. Autrement dit, elle exercerait un rôle d'épargne sur le besoin en vitamine B 12. (confère tableau n° 1). Ceci a été démontré plus particulièrement chez Eschérichia Coli (DAVIS et MINGIOLI 1950) (21 a) et chez l'animal (ASCHKENASY et PARIENTE 1950) (2 a) (cités par VALENCIA 1974) (46).

. Il faut faire une place à part à l'hypothèse appuyée par le travail de F.I. HAURANI (1973) (23). Selon cet auteur, le rôle de la vitamine B 12 se situerait au niveau de la synthèse de la thymidilate-synthétase. Cette enzyme, qui a pour cofacteur le N^5, N^{10}-méthylène THF, est plus active dans les lymphocytes (mis en culture et stimulés par une Phyto-agglutinine) provenant de sujets sains que dans ceux provenant de sujets défficients en folates, de Biermériens, en rémission, ou à plus forte raison, en phase d'état de la maladie. Cette constatation laisse supposer une action directe de la vitamine B 12 au niveau de l'activité de l'enzyme. Mais les préparations purifiées de thymidilate synthétase ne révèlent pas la présence de vitamine B 12, ce qui élimine, d'après cet auteur, l'hypothèse d'une action de la vitamine B 12 au niveau de l'activité de l'enzyme.

Quant à l'hypothèse émise par l'auteur, qui suggère une action de la vitamine B 12 au niveau de la synthèse de la thimidilate-synthétase, si elle est séduisante par son caractère original, nécessite, cependant, d'être vérifiée par une expérimentation approfondie.

De l'ensemble de cette discussion, découle la conviction que les actions de la vitamine B 12 et des folates sont étroitement liés et concernent :

1°- sur le plan biochimique les phénomènes relatifs à la synthèse du DNA

2°- et sur le plan physiologigue les processus se rapportant à la croissance, la maturation et la division cellulaire.

Le problème peut être abordé d'une façon nouvelle qui consiste à étudier la répartition de ces deux cofacteurs dans la cellule.

Cette étude est rendue possible par les progrès dans le domaine de l'isolement et de la connaissance des structures cellulaires. Quelques études ont été tentées dans ce sens à l'aide de la vitamine B 12 marquée au cobalt 60 dans les fractions cellulaires d'origine animale (BAHTT et Coll. 1960) (14 a), (NEWMAN et Coll. 1961) (49 a) ou bactérienne (KASKHETT et W.S. BECK 1966) cités par VALENCIA 1974 (46). Les résultats obtenus avec cette méthode divergent selon les auteurs qui se heurtent à la difficulté technique majeure créée par le métabolisme particulier de la vitamine B 12 qui subit les phénomènes de stockage, dûs aux fortes doses injectées.

Il est plus intéressant d'étudier la répartition intracellulaire de la <u>vitamine B 12 et des folates endogènes</u>, cette investigation a été abordée par O. BERTAUX, R. VALENCIA, J. ODDOS-RAMUS, H. N'GUYEN CONG et A. BOER (14').

Cette étude est rendue possible grâce aux dosages microbiologiques spécifiques au niveau des fractions subcellulaires. En effet, de tels dosages sont suffisament sensibles et reproductibles pour permettre une estimation quantitative de la localisation des cobalamines et des folates dans les structures infracellulaires et éviter l'écueil de l'expérimentation in vivo pqr apport de vitamine B 12 exogène. Les résultats sont obtenus dans de conditions plus physiologiques.

Le foie par sa forte teneur en cobalamines et en folates est particulièrement indiqué pour ce genre d'étude.

D E U X I E M E P A R T I E

I - MATERIEL ET METHODES

1°) Préparation des homogénats de foie de rat :

Les animaux sont des rats mâles de la souche Wistar agés de 3 à 4 mois, pesant environ 300 gr. et maintenus à jeun pendant 17 Heures avant le sacrifice par décapitation.

Les foies sont perfusés in situ successivement avec 40 ml d'une solution de NaCl 15 . 10^{-2}M et 20 ml d'une solution de saccharose 25 . 10^{-2}M, Ca . Cl_2 1 . 10^{-3}, KH_2PO_4 8 . 10^{-4}M à pH 6,8 à 4° C.

Les foies de rats sont ensuite rapidement prélevés, pesés puis homogénéisés dans deux volumes de milieu I : C'est-à-dire : 2.10^{-2}M tris HCl pH 7,4 ; 5.10^{-2}M KCl ; 5.10^{-3}M Mg2Cl2 ; 0,01g/l de polyvinyl sulfate et 25.10^{-2}M de saccharose ;

(200 ml de milieu I pour 100 gr. de foie).

L'homogénat obtenu est contrôlé au microscope à contraste de phase.

2°) Préparation des fractions cellulaires (Tableau n° II) :

La préparation des fractions cellulaires est effectuée selon la méthode de ZALTA (52) et J.P. BECK (5).

L'homogénat contrôle est centrifugé à 800 g pendant 15 mn (SERVALL). On obtient un culot que nous appellerons C 0,8 qui servira à la préparation des noyaux et un surnageant S 0,8.

Le S 0,8 est centrifugé à 10 000 g pendant 15 mn. On obtient un culot 10 000 g (C 10), contenant les mitochondries et des lysosomes, qui est conservé. Le surnageant 10 000 g (S 10) est centrifugé à 24 000 g pendant 15 mn.

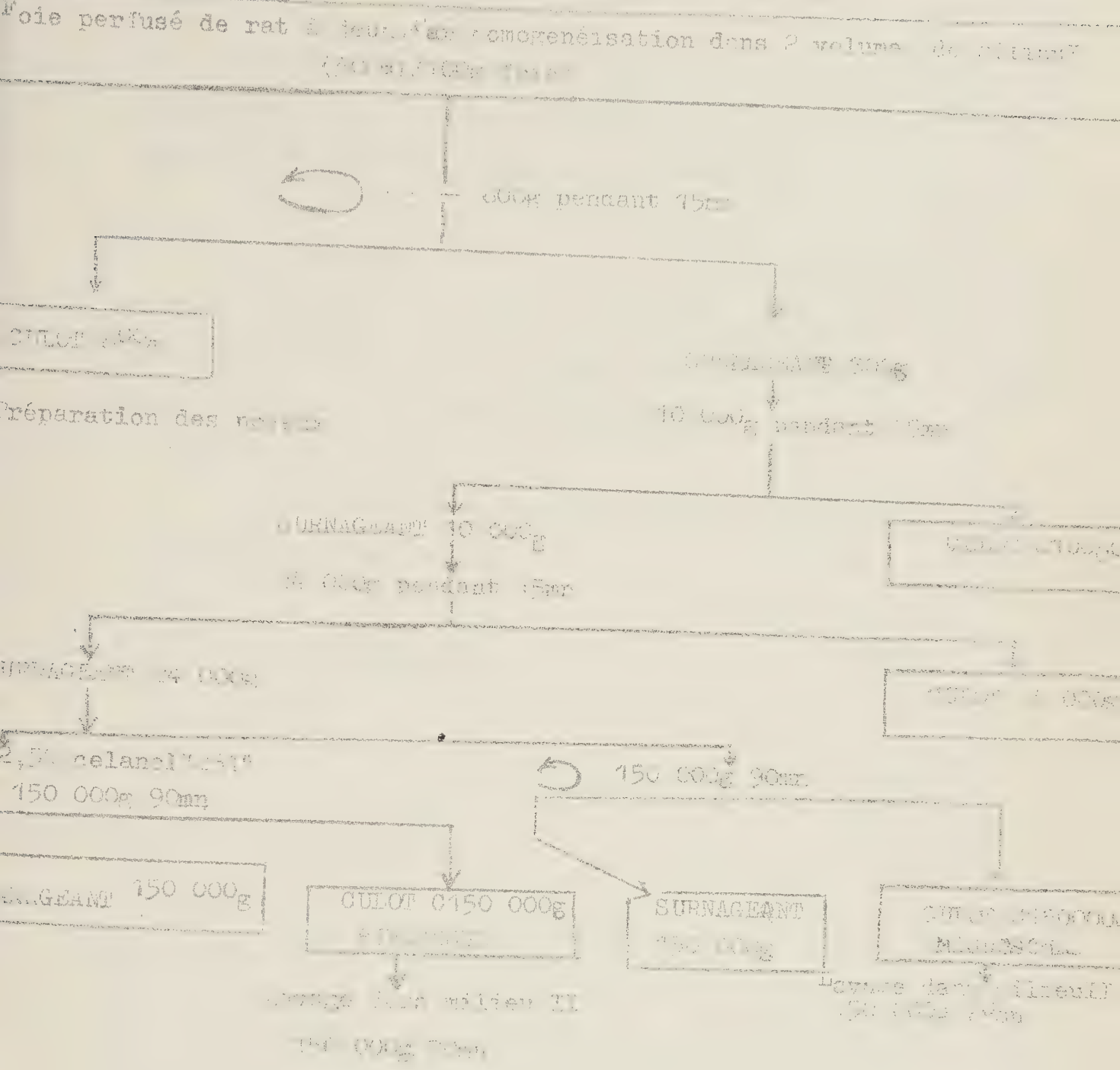
Le culot 24 000 g (C 24) est conservé ; il comprend les "fractions lysosomes" les plus légères contaminées par quelques "gros" microsomes.

Le surnageant 24 000 g (S 24) est divisé en deux fractions égales :

- On ajoute 2,5 % d'un agent tensio-actif anionique du type aryl-alkyl-phénol polyoxyéthylèn, partiellement sulfaté (célanol "251"). Cette fraction est ensuite centrifugée à 150 000 g pendant 90 mn (Spinco). Le surnageant est éliminé. Le culot est composé de ribosomes.

TABLEAU N° II

PREPARATION DES FRACTIONS [illegible]



lieu I : Tampon tris-HCL PH 7,4 2.10 $^{-2}$M ; KCL 5.10 $^{-2}$M ; MgCL2 5.10 $^{-2}$M ; PVS 10mg/l ; Saccharose [illegible]

lieu II : Comme milieu I, sans saccharose

SYMBOLE : Signifie centrifugation.

- L'autre fraction du S 24 est centrifugée à 150 000 g pendant 90 mn. Le surnageant 150 000 g (S microsomes 150), est conservé. Le culot est composé de microsomes.

Les culots de ribosome et de microsome sont repris dans à partir du milieu II (milieu I sans saccharose) puis centrifugés à 150 000 g pendant 70 mn (lavage). Les culots obtenus sont appelés culot ribosome 150 et culot microsome 150.

Les dosages de vitamine B 12, de cobalamines totales et d'acide folique seront effectués sur les fractions :

Homogénat total

C 0,8

C 10 S 10

C 24 S 24

C Ribosome 150 S Ribosome 150

C Microsome 150 S Microsome 150

La pureté des préparations de ribosomes a été contrôlée au microscope électronique.

3°) Préparation des noyaux (tableau n° III) :

Les noyaux sont préparés à partir du culot C 0,8 selon la méthode de ZALTA et Coll. (51).

Ce culot est homogénéisé à l'ultra-turrax (80 volts pendant 1 mn) en milieu Earle-K - Saccharose $25 . 10^{-3}$M final ; puis centrifugé 8 mn à 1000 g sur un milieu Earle-K-Saccharose $32 . 10^{-2}$M final.

On obtient un culot nucléaire brut (C N B) et un surnageant S 1 qui est conservé.

Le C N B est remis en suspension dans un petit volume de milieu Earle-K Saccharose $25 . 10^{-3}$M final homogénéisé à l'ultra-turrax pendant 1 mn à 80 volts puis dilué dans le milieu Earle-K Saccharose $12 . 10^{-2}$M final et centrifugé à 600 g pendant 3 mn. On obtient un S 1 0,6 qui est analysé.

Le culot C 1 0,6 est repris dans un milieu Earle-Na saccharose $20 . 10^{-2}$M final homogénéisé à l'ultra-turrax pendant 10 secondes à 50 volts) puis centrifugé à 800 g pendant 5 mn sur un milieu Earle Na-Saccharose $32 . 10^{-2}$M final. Ont obtient un S II 0,8 qui est analysé.

TABLEAU N° III

Préparation des Noyaux

C 0,8

omogénéisation dans 10 ml Earle K - Saccharose $2,5.10^{-2}$ M Turrax 80 volts pour 1 minute (final)

entrifugé sur 25 ml Earle K - Saccharose 32.10^{-2} M (final) 1000 g 8 minutes

S_1 analysé

C N B

uspension dans $2,5.10^{-2}$ M Earle K-Saccharose 0,025 M (final) Turrax 1 mn 80 volts

Earle K - Saccharose 0,12 M final Centrifugation 5 mn 600 g final

S_1 0,6 Analysé

C^I 0,6

omogénéisé dans $20\ 10^{-2}$ M Earle Na - Saccharose 10'' Turrax 50 volts final

Centrifugé sur Earle Na - Saccharose 32.10^{-2} M 800 g 5 mn (final)

S^{II} 0,8 Analysé

C^{II} 0,8

esuspendu dans 2 ml Earle Na - Saccharose 20.10^{-2} M 10'' Turrax 50 volt (final)

On ajoute 12,5 M P T_{12} 1 mn Turrax 50 volts puis 11% NPT_{12} 1mn Turrax 50 Volts

dilution rapide dans ($20\ 10^{-2}$ Earle Na- Saccharose (final))

Filtrtion et centrifugation sur étamine à 600 g 5mn

S_{II} 0,6

C_{II} 0,6

esuspendu dans une solution Earle Na - Saccharose 20.10^{-2} M (final) et centrifugé dans une solution Earle Na - Saccharose 32.10^{-2} M (final) 800 g 5mn

S_{III} 0,8 Analysé

C_{III} 0,8

Noyaux Purs

Le culot C II 0,8 est remis en suspension dans un petit volume de milieu Earle-Na Saccharose 20 . 10^{-2}M final puis homogénéisé à l'ultra-turrax pendant 10 secondes à 50 volts. On ajoute environ 12 % de NPT 6 (5) puis on brasse à l'ultra-turrax pendant 2 mn à 50 volts ; enfin, on ajoute environ 11 % de NPT 12 (5) et on brasse de nouveau à l'ultra-turrax pendant 1 mn à 50 volts.

On effectue ensuite une dilution rapide avec du milieu Earle-Na Saccharose 20 . 10^{-2}M final puis la solution est filtrée sur étamine et centrifugée à 600 g pendant 3 mn. On obtient un S II 0,6 qui est éliminé (il contient le détergent).

Le culot C II 0,6 est remis en suspension dans un milieu Earle-Na Saccharose 20 . 10^{-2}M final puis centrifugé à 800 g pendant 5 mn sur un milieu Earle Na Saccharose 32 . 10^{-2}M final. On obtient un S III 0,8 qui est analysé.

Le culot C III 0,8 contient des noyaux purs.

Les dosages de Vitamine B 12, de cobalamines et d'acide folique sont effectués sur les fractions :

C I 0,8	
C N B	S 1
C I 0,6	S I 0,6
C II 0,8	S II 0,8
C II 0,6	S II 0,6
C III 0,8	S III 0,8

4°) DOSAGES MICROBIOLOGIQUES :

a) Généralités :

Le dosage microbiologique a pour objet de déterminer le taneur d'un facteur de croissance contenu dans l'extrait d'un échantillon complexe biologique ou non.

Le microorganisme utilisé doit obligatoirement présenter une dépendance absolue vis à vis de ce facteur.

Cette détermination se fait par comparaison entre les taux de croissance sensiblement proportionnels du microorganisme

spécifique placé dans un milieu de culture additionné de doses connues croissantes de ce facteur (courbe standard) et ceux obtenus avec le même microorganisme cultivé sur le même milieu de culture additionné de volumes définis de l'échantillon dans lequel on veut doser le facteur de croissance étudié.

La sensibilité des dosages microbiologiques employés ici, est de l'ordre du nanogramme.

b) Dosage des cobalamines totales :

L'ensemble des analogues cobalamines ou cobalamines totales est dosé grâce à Escherichia-Coli selon la technique de CALLET et RERAT (20 b).

c) Dosage de la vitamine B 12 :

Il est effectué par Ochromonas-Malhamensis selon la méthode de FORD (24) modifiée par N'GUYEN CONG et VALENCIA (37).

d) Dosage des folates totaux libres :

Ce dosage est effectué avec Streptococcus faecalis ; il ne permet pas le dosage des formes méthylées.

Au cours de ce dosage, il est important de suivre l'évolution du potentiel d'oxydo-réduction ; le pH doit se maintenir à 6,8 (pH 6,8). Ces contrôles sont effectués directement dans le milieu

agité.

5°) AUTRES DOSAGES

Les dosages de protéines sont effectués selon la méthode de LOWRY (44).

Les dosages de RNA sont effectués par la détermination colorimétrique du Ribose par l'Orcinol, selon la méthode de SLATER modifiée par ZALTA (66).

II - RESULTATS

1°) Distribution de la Vitamine B 12, des cobalamines totales et de l'acide folique dans les fractions cellulaires :

- Première expression des résultats :

Le tableau (IV), à titre d'exemple, exprime les résultats obtenus au cours d'une des six expériences d'analyse des fractions subcellulaires. Les résultats figurant dans ce tableau sont exprimés en migrogrammes pour 100 g de foie et en pourcentage par rapport aux valeurs obtenues pour l'homogénat total considéré comme 100 %.

On constate tout d'abord, que la somme des quantités de cobalamines mesurées dans l'analyse du premier culot et du premier surnageant de centrifugation S 0,8 + C 0,8 est supérieure à la quantité mesurée dans l'homogénat initial. Cette différence suggère qu'une quantité non négligeable des vitamines liées se trouve libérée lors de la première centrifugation à 800 g, elle nous a amené à exprimer une seconde fois, les résultats en fonction du pourcentage de l'ensemble reconstitué (S 0,8 + C 0,8) appelé "homogénat calculé" (tableau IV).

TABLEAU N° IV et TABLEAU N° V

FRACTION CELLULAIRE IV (MICROGRAMMES)

LEAU N° IV	Pour %	Cobalamines totales En Microgrammes	Pour %	B [illegible] (Microgrm.)	Pour %	Acide Folique Libre (Microg
omogénat	100 %	14,416	100 %	15,351	100 %	281
0,8	45,6 %	6,579	41,71 %	6,412	38 %	107
0,8	85 %	12,305	62 %	9,300	57 %	160
ogénat calculé 0,8 + C 0,8	130 %	18,884	103,7 %	15,912	75 %	267
LEAU N° V						
S_{10}	21,8 %	3,137	13,1 %	2,015	17 %	48
C_{10}	11,2 %	1,613	6,5 %	1,098	13 %	37
S_{24}	15,2 %	2,186	13,9 %	2,142	15 %	42
C_{24}	1,4 %	0,207	0,5 %	0,075	4,6 %	13
S_{150}	9 %	1,300	4,6 %	0,707	12 %	34
C_{150}	0,2 %	0,024	4,6 %	0,005	1,4 %	4

- Analyse des différentes fractions subcellulaires par la méthode des dosages microbiologiques (sensibilité de l'ordre du nanogramme).

- Les résultats sont exprimés en microgrammes et en % par rapport à la quantit contenue dans l'homogénat total.

Le culot C 0,8 contient la majeure partie des trois facteurs analysés. Ceci nous a conduit à préparer des noyaux purifiés à à partir du culot C 0,8.

- Homogénat total par rapport à l'Homogénat calculé :

Le tableau VI permet la comparaison entre les résultats (de quatre expériences) exprimés par rapport à l'homogénat total (100 %) et par rapport à l'homogénat calculé (S 0,8 + C 0,8 = 100 %).

Les calculs de rendement de la manipulation ne sont significatifs que lorsqu'ils sont effectués à partir des résultats exprimés par rapport à l'homogénat calculé ; ils sont remarquablement élevés puisque l'on peut constater qu'en moyenne nous récupérons 90 % des valeurs initiales.

Les culots C^{10}, C 24, C 150 ne contiennent respectivement que :

5 % (C 10), 1 % (C 24) et 7 % (C 150) des cobalamines totales

1 % (C 10), 0,5 % (C 24) et 3 % (C 150) de vitamine B 12

1 % (C 10), 0,5 % (C 24) et 0,8 % (C 150) de folates libres

Le surnageant S 150, ou phase cytoplasmique soluble, représente 10 % des cobalamines ; 5 % de la vitamine B 12 et 12 % des folates libres.

TABLEAU N° VI

	FRACTIONS	COBALAMINES Expérience n° III	IV	V	VI	VITAMINE B12 Expérience n° III	IV	V	VI	FOLATES Expérience n° III	IV	V	VI
Homogénats Mesurés	C 0,8	72 %	85 %	-	106 %	84 %	62 %	-	99 %	60 %	60 %	-	[illegible]
	C 10	6 %	11 %	-	6 %	4 %	6,5 %	-	6 %	1,7 %	13 %	-	[illegible]
	C 24	0,6 %	1,4 %	-	2,5 %	0,3 %	0,5 %	-	1,8 %	0,6 %	5 %	-	[illegible]
	C 150	1,4 %	0,2 %	-	2,1 %	1 %	0,03 %	-	0,8 %	0,2 %	1,4 %	-	[illegible]
	S 150	12 %	9 %	-	11 %	8 %	6 %	-	7 %	12 %	13 %	-	[illegible]
	Total	90,0 %	106,6 %	-	127,6 %	97,3 %	75,03 %	-	114,6 %	74,5 %	92,4 %	-	[illegible]
Homogénats Calculés	C 0,8	69 %	65 %	80 %	74 %	69 %	60 %	84 %	84 %	-	-	48	[illegible]
	C 10	3,5 %	6 %	4 %	4 %	4 %	6,3 %	2,5 %	5 %	-	-	6,5 %	[illegible]
	C 24	0,6 %	1,1 %	1,1 %	18 %	0,3 %	0,5 %	0,3 %	1,0 %	-	-	2,7 %	[illegible]
	C 150	1,3 %	0,1 %		1,5 %	0,9 %	0,02 %		0,7 %	-	-		[illegible]
	S 150	11 %	7 %	12 %	7 %	6,4 %	6 %	1,7 %	6 %	-	-	28 %	[illegible]
	Total	81,4 %	79,2 %	97,1 %	104,5 %	80,6 %	72,83 %	88,5 %	96,7 %	-	-	85,2 %	[illegible]

Comparaisons des résultats exprimés d'une part en % par rapport à la quantité mesurée dans l'homogénat total et d'autre part, en % par rapport à "l'homogénat calculé" (C 0,8+S 0,8=100 %) voir texte pages 7[illegible] et 77.

Le tableau VII exprime les résultats en microgrammes par 100 g de foie des fractions ribosome et microsome avant et après lavage par le milieu II. Il permet de constater que les préparations de ribosome et microsomes libèrent par simple lavage une fraction importante des vitamines étudiées.

Notons que la fraction ribosome est plus "pauvre" en vitamines que la fraction microsome. Seule cette dernière est citée dans les tableaux précédents.

TABLEAU N° VII

CM	SLM	CLM		CR	SLR	CLR
0,131	0,102	0,069	...COBALAMINES TOTALES	0,071	0,068	0,031
0,065	0,020	0,012	... VITAMINE B 12	0,020	0,013	0,006
3,4	1,9	1	... FOLATES LIBRES ...	0,15	0,16	0,008

- CM : Culot de microsomes
- SLM : Surnageant des microsomes après lavage
- CLM : Culot de microsomes après lavage
- CR : Culot de ribosomes
- SLR : Surnageant des ribosomes après lavage
- CLR : Culot de ribosomes après lavage

2°) Distribution de la Vitamine B 12, des Cobalamines Totales et de l'Acide Folique dans les fractions Cellulaires :

a) Observations morphologiques :

Les observations morphologiques effectuées au microscope à contraste de phase pendant les différentes étapes de préparation de noyaux ont été généralement contrôlées au microscope électronique (cf matériel et méthode).

Ces observations montrent que :

- Le surnageant S 1 contient de nombreux débris cytoplasmiques de petite taille, mais pas de cellules, pas de noyaux.

- Le culot nucléaire brut contient des noyaux entiers, bien formés mais, aussi des débris cytoplasmiques indépendants des noyaux.

- Le surnageant S I 0,6 contient de petits débris très réfringents, pas de noyaux.

- Le culot C II 0,6 noyaux à membrane nucléaire bien dessinée avec quelques débris.

PHOTO

Sur cette photo, prise au microscope électronique, nous remarquons la présence de plusieurs noyaux isolés dont la membrane nucléaire apparaît très nette.

- Le culot C III 0,8 contient des noyaux isolés à membrane nucléaire nette (voir photo) dont la pureté a été contrôlée au microscope électronique.

b) Discussion des résultats :

Les résultats obtenus avec les différentes préparations de noyaux sont pratiquement identiques, nous avons choisi d'exposer dans le tableau VII les résultats de l'expérience. Ceux-ci sont exprimés en pourcentage de chacun des facteurs par rapport au contenu du culot C 0,8.

Les lavages du culot C 0,8 en milieu salin sur gradient de saccharose entraînent des pertes variables en vitamines (autour de 30 %).

Le détergent a pour effet de décrocher la presque totalité des vitamines qui ne représentent pour les noyaux purifiés que 1 à 4 % pour les Cobalamines ; 1, à 2 % pour la vitamine B 12 ; 0 à 0,4 % pour l'Acide Folique (C III 0,8).

Les vitamines ne sont pas détruites par le détergent puisqu'on les retrouve dans le dernier surnageant (S III 0,8)

TABLEAU N° VII'

	COBALAMINES	VITAMINE B 12	FOLATES LIBRES
CNB	47 %	69 %	28 %
C II 0,8	45 %	49 %	5,2 %
SURNAGEANT	42 %	51 %	23,1 %

TRAITEMENT DES FRACTIONS OBTENUES PAR LES DETERGENTS

(NPT6 et NPT 12)

C III 0,8	1,1 %	1,9 %	0,1 %
S III 0,8	15,5 %	18,6 %	8,3 %

- Les résultats sont exprimés en pourcentage de la quantité de chacun des facteurs dans l'homogénat total.

Ces résultats suggèrent que la vitamine B 12, les Cobalamines et l'Acide Folique sont associées principalement aux structures membranaires (feuillet externe de la membrane nucléaire et ergastoplasme). En effet nous avons pu constater qu'à la suite de lavages aussi bien, des noyaux que des microsomes, nous retrouvons une quantité importante de vitamines dans les surnageants.

Le feuillet externe de la membrane nucléaire qui paraît fixer préférentiellement ces facteurs est d'ailleurs en continuité avec l'ergastoplasme.

Toutefois, il n'est pas exclu que des modifications de perméabilité de la membrane nucléaire en cours de préparation entraînent une fuite des Cobalamines et des Folates solubles dans le milieu de purification des noyaux.

Cette difficulté a conduit à envisager de reprendre ces expériences en utilisant un milieu non aqueux pour la préparation des noyaux cellulaires.

D I S C U S S I O N

E T

C O N C L U S I O N S

III - DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES :

Les mécanismes d'action et les différents rôles des folates et des cobalamines sont passés en revue, en centrant l'analyse sur la synthèse du DNA, et la division cellulaire.

- La structure et le mécanisme d'action des folates et des cobalamines sont examinés de manière à faire ressortir les sites de la molécule directement engagés dans les activités enzymatiques.

- Le principal rôle des folates est le transfert des groupements monocarbonés nécessaires à la méthylation de l'uridine en thymine (par le N^5, N^{10}-Méthylène-THF) et celle de l'homocystéine en méthionine (par le N^5-Méthyl-THF).

- Si le Coenzyme B 12 contrôle la réduction du ribose des ribonucléotides en désoxyribose chez plusieurs microorganismes, notamment chez Lactobacillus Leishmanii, son action dans ce domaine est encore controversée dans le cas des cellules animales. Par contre, sa participation aux processus de méthylation est certaine ; on pense qu'il agit en activant les radicaux méthyles qui subissent des transferts lors des réactions métaboliques ou qui font partie d'un substrat.

- Les folates interviennent directement dans les processus de synthèse du DNA en permettant notamment la méthylation de l'uridine qui se transforme en thymidine. Le rôle important attribué au Coenzyme B 12 dans la réduction des ribonucléotides est douteux chez les animaux, mais la vitamine B 12 agit d'une façon générale sur les folates ou sur leur activité et peut être même sur la synthèse de la thymidilate synthétase dont le Coenzyme est le N^5, N^{10}-Méthylène-THF.

- Les cellules spécifiquement atteintes par les carences en folates ou en cobalamines ont une tendance au gigantisme par suite d'un arrêt de la synthèse du DNA avec blocage de la division cellulaire, tandis que les synthèses des RNA et des protéines se poursuivent. Les chromosomes des mégaloblastes présentent des ruptures de chromatides et des malformations qui mettent en cause non seulement l'intégrité de la structure primaire et secondaire du DNA, mais aussi sa configuration tertiaire (despiralisation et contraction incomplète). Les résultats obtenus sur les animaux en carence chronique sont trop difficiles à interpréter par suite des états de déficiences complexes selon les particularités du métabolisme tissulaire et les adaptations de l'organisme.

- La répartition des folates et des cobalamines au niveau des structures cellulaires, analysée par les techniques de fractionnement cellulaire et de dosage microbiologique montre une prédominance de ces facteurs dans la fraction nucléaire et

dans une moindre mesure dans la fraction microsomale de la cellule. Toutefois, ces facteurs paraissent après lavage être préférentiellement liés aux structures membranaires (feuillet externe de la membrane nucléaire et ergastoplasme). En effet, un traitement léger aux détergents provoque la libération massive de ces facteurs et par conséquent, on peut émettre l'hypothèse d'une association vitamines-membranes. Il faut cependant souligner que les expériences décrites dans cette thèse constituent plus une approche du problème qu'une étude véritablement systématique. Un prolongement immédiat de ce travail serait l'étude de l'association vitamines-membrane et ses caractéristiques. Seule l'élucidation de ce point permettrait d'aller plus avant dans l'étude du mécanisme d'action et du rôle de ces vitamines dans la biosynthèse du DNA et de la perturbation de la division cellulaire. L'intérêt de cette étude de la localisation est de donner une base quantitative au travail qui pourrait être exploitée par des travaux ultérieurs portant simultanément sur la localisation de ces facteurs y compris dans les milieux non aqueux (SIEBERT et BERCK) (qui limiteraient la diffusion, possible, hors du noyau) et sur la localisation des systèmes enzymatiques par lesquels ils interviennent dans la biosynthèse du DNA.

En tous cas, il convient de souligner la convergence de la répartition de ces facteurs B 12 et acide folique qui se retrouvent principalement liés aux mêmes structures cellulaires.

En effet, la division cellulaire intervient après une étape de méthylation intense du DNA appelée par ces auteurs "surméthylation". La mise en évidence de ce phénomène a pu se faire grâce à des expériences réalisées sur une culture d'une algue unicellulaire B 12 dépendante (Euglena-Gracillis Z), soumise à une synchronisation par la lumière. La méthylation est étudiée grâce à l'incorporation de méthionine marquée. Lorsque ce protozoaire est carencé en vitamine B 12, le phénomène de "surméthylation" n'existe plus et la division cellulaire est bloquée.

- L'ensemble des observations que nous avons rapportées, en particulier celles faites par VALENCIA, BOLR et Collab. sur la localisation intracellulaire des facteurs vitaminiques étudiés, et, les résultats récents obtenus sur Euglena-Gracillis Z, montrent qu'une interprétation trop rigide du fonctionnement des systèmes enzymatiques impliqués dans la division cellulaire et la biosynthèse du DNA et, faisant intervenir les folates et les cobalamines, conduit à une non compréhension des phénomènes véritables. Les formes d'intervention de ces facteurs, les réactions où ils sont nécessaires sont à la fois complexes et variés. En outre, ces voies métaboliques connaissent vraisemblablement des mécanismes de suppléance qui rendent difficile l'approche du problème principal chez les êtres organisés comme les animaux supérieurs.

B I B L I O G R A P H I E

(1) - ABELES, R.H., and Lee, H.A. (1961)
J. Biol. Chem. 236, 2347

(2) - ABRAMS, R.H., (1965)
J. Biol. Chem. 240, P.C. 3697

(2a) - ASCHKENASY A., and PARIENTE, P. (1950)
Suppléance de la Méthionine à l'égard de la vitamine B 12 dans la réfection pondérale de l'inanition protéique. Supériorité des extraits antipernicieux sur la Vitamine B 12 dans la réparation de l'énythropoïèse.
C.R. Acad. Sciences, Paris, 230, 2339 - 2341.

(3) - BARKER, H.A., and WEISSBACH, H., SMITH, R.D., MUNCH-PETERSEN, A., TOOHEY, J.I., LADD, J.N., VOLCANI, B.E. and WILSON, R.M., (1960)
J. Biol. Chem. 235, 480

(4) - BARKER, H.A., WEISSBACH, H., SMITH, R.D., (1958)
Proc. Nath. Acad. Sci. (U.S.) 44, 1093

(4a) - BARKER, H.A., (1972)
Coninoïd - dépendent Enzymatic Reactions.
Ann. Rev. Biochem., 41, 55 - 90

(5) - BECK, J.P., (1969)
Contribution à l'étude des ARN de la cellule hépatique chez le rat normal ou hypophysectomisé.
Thèse de doctorat es-Sciences - Strasbourg.

(6) - BECK, W.S., GOULIAN, M., HOOK, S. (1962 a)
Biochim. Biophys. Acta. 55, 470

(7) - BECK, W.S., HOOK, S., BARNETT, B.H., (1962 b)
Biochim. Biophys. Acta. 55, 455

(8) - BECK, W.S., (1964)
Medicine, 43, 715

(9) - BECK, W.S., and HARDY, J. (1965 a)
Federation proc. 24, 421

(10) - BECK, W.S., and HARDY, J., (1965 b)
Proc. Natl. Acad. Sciences (US), 54, 286

(11) - BECK, W.S., GOULIAN, M., KASKETT, S.,
Trans. Assoc. Am. Physicians, 78, 343

(12) - BECK, W.S., (1968)
Vitamines and Hormones advances in Research and applications, 26, 423

(13) BERNHAUER, K., MULLER, O., and MULLER, G., (1962)
Biochem. Z. 336, 102

(14) BERTAUX, O., Valencia, R, ODDOS RAMUS, J, N'GUYEN-CONG, H, et Boer, A. (1969)
Sur la localisation intracellulaire des Cobalamines et des folates du foie de rat.
J. Physiologie., 61, Suppl. 2, 217

(14) BERTAUX, O., et VALENCIA, R., (1972)
J. de Physiologie, 349, 350 A

(14a) BHATT, R., WAGLE, S.R., JOHNSON, B.C. (1960)
Proc. Symp. Proteines, 73, 77

(15) BLAKLEY, R.L., and BARKER, H.A. (1964)
Biochem. Biophys. Res. Commu., 16, 391

(16) BLAKLEY, R.L., and CHAMBER, R.K. (1966)
Biochem. biophys. Res. Commun. 24, 418

(16a) BLAKLEY, R.L. (1969)
The Biochemistry of folic and related pteridines
ed. North - Holland - Amsterdam - London

(17) BRADY, R.O., and BARKER, H.A., (1961)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 4, 373

(18) BRADY, R.O., CASTANERA, E.G., BARKER, H.A., (1962)
J. Biol. Chem. 243, 381

(19) BROWNSTEIN, A.M., and ABELES, R.H. (1961)

J. Biol. Cem. (236), 1199

(20) - CAZAL, P., (1957)

Les anémies mégaloblastiques et prémagaloblastiques

Erythrocytes et Enythropathies

435, 479

(20a) - CHANARRIN, I., (1964)

Urinary formiminoglutamic acid excretion in relation

to folic acid func

Proc. Roy. Sol. Med. 57, 384 - 388

(21) - DOLPHIN, D.H., JOHSON, A.W., RODRIGO, R.

Ann. NY. Acad. Sci. 112, 590

(21a) - DAVIS, B.D., and MURGIOLI, E.S. (1950)

Mutants of E. Coli. requiring methionine

or Vit. B 12

J. Bact. 50, 17 - 28

(22) - DOWNING, M., and SCHWEIGENT, B.S., (1956)

J. Biol. Chem. 220, 521

(22a) - ELFORD H.L. (1968)

Effect of hydroxy-Uréa on ribonucléotide-réductase

Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 129 - 135

(23) - FARID I., HAURANI (1973)

Vitamin B 12 and the megaloblastic development Science

182, 78 - 79

(24) - FORD, J.E., (1953)
Brit. J. Nutrition. 7, 299 - 306

(25) - FREY, P.A., and ABELES, R.H., (1966)
J. Biol. Chem. 220, 521

(26) - FUJIOKA, S., and ROBERT, S. (1969)
Ny. Chim. Res. 17, 343

(26a) - FUJIOKA, S., and SILBERT, R. (1970)
Purification and properties of ribonucléotide-réductase from leukemic mouse spleen.
J. Biol. Chem. , 245, 1688 - 1693

(26b) - GARDINER, R.C., and SILVERMANN, M. (1960)
Influence of Vit B 12 on urinary excretion of folic Acid metabolites by therat
Arch. Biochem. Biophys. 89, 313 - 317

(27) - GLAZER, H.S., MUELLER, J.F., JANOLD, T., SAKURAI, K., WILL, J.J., and VILTER, R.W., (1954)
J. Lab. Chim. Med. , 43, 905

(28) - GOTTESMAN, M.M., and BECK, W.S., (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun., 24, 353

(29) - GOULIAN, M., and BECK, W.S., (1966 a)
Biochem. Biophys. Acta. 129, 336

(30) - GOULIAN, M., and BECK, W.S., (1966 b)
Biochem. Biophys. Acta. 124, 423

(31) - GOULIAN, M., and BECK, W.S., (1966 c)
J. Biol. Chem. 241, 4233

(32) - GUEST, J.R., MELLEINER, C.W., GROSS, N.J., and WOODS, D.D., (1960)
Biochem. J. 76, 396

(33) - GUEST, J.R., FRIEDMAN, S., WOODS, D.D., and SMITH, E.L., (1962)
Nature. 195, 340

(34) - HIMISCHEN, M.A., and BECK, W.S., (1968)
Un publische d'observation

(35) - HOGENKAMP, H.P.C., BARKER, H.A., and MASSON, M.S. (1963)
Arch. Biochem. Biophys., 100, 353

(36) - KITTAY, E., NUTT, W.S., and SNELL, E.E., (1949)
J. Biol. Chem., 177, 993

(36a) - KASKEHETT, S., and BECK, W.S. (1966)
Biochem. Biophys. Acta., 129, 350 - 358

(37) - KLEEBERG, U.R., and BECK, W.S. (1968)
Un published observation.

(38) - KRAKOFF, F.H., BROWN, N.C., and REICHARD, R., (1968)
Canc. Res. , 28 - 1559

(38a) - KUTZBACH, C., GALLOWAY and STOKSTAD E.L.R. (1967)
Influence of. Vit. B 12 and Methionine ou Levels of folic Acid. compounds and folate enzymes in rat liver. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 124, 801-805

(39) - LARSSON, A., and NEILANDS, J.B. (1966)
Biochemi. Bio. Phys. Res. Commun 25, 222

(40) - LEHNINGER, A.L., (1970)
Biochemestry, The Molecular Basis of cell structure and fonctions
J.H. University, School of medicine

(41) - LESSNER, H.E., and FRIEDKIN, M. (1959)
Chim. Res., 7, 207

(42) - LESBER-SMITH, E. (1965)
Vitamin B 12, Methen, London - IIIe edition

(43) - LOUISOT, P., 1969
Vitamines - Coenzymes - Simep Editions 37 - 41

(43a) - LOUISOT, P., 1969

Vitamines - Coenzymes - Simep Ed. 43 - 49

(44) - LOWRY, O.H., ROSEBROUGLET, N.J., FARR, A.C., and RANDALL, R.Y., (1951)

J. Biol. Chem. 193, 265

(44a) - MANSON (1961)

Vitamin B 12 and deoxyribose-synthesis

Vitamin B 12 and instruisec Factor. 2

Europäisches symposion - Hamburg 191 - 196

(45) - MARINONE (1951)

Experientia, 7, 227

(46) - MARINONE (1954)

Revue hematologique, 9, 341

(47) - MOORE, E.C., and HIRLBERT, R.B. (1966)

J. Biol. Chem. 241, 4802

(48) - MUNCH-PETERSEN, A., (1960)

Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 109

(49) - N'GUYEN CONG, H., and VALENCIA, R., (1964)

Bull. Soc. Chim. Biol. , 46, 751 - 754

(49a) - NEWMAN, G.E., O'BRIEN, J.R.R., SPRAY, G.H., WITTS, L.J., (1961)

Distribution of Vit. B 12 in rat liver fractions
Vitamin B 12 and instruisec Factor. 2
Europäisches symposion, Hamburg 424 - 432
ed. F. EUKE, Stuttgart

(49b) - NOROHNA, J.M., and SILVERMANN M. (1961)

On folic acid, Vit. B 12, Methionine and formimino-glutamic acid metabolisme (vit. B 12 und intruisec Factor 2) Europäischer symposion Hamburg
ed. F. EUKE, Stuttgart - 728 - 736

(49c) - NOROHNA J.M., and SILVERMANN (1962)

J. Biol. Chem., 237, 3299 - 3302

(50) - PFEIFER, H.F., and BECK, W.S. (1968)

Im publighed Results

(51) - POLONOVSKY, M. (1965)

Biochimie Medicale Fasc. 1
8ème Edition - Masson édit. Paris

(52) - REICHARD, P., and RUTHBERG, L. (1960)

Biochem. Biophys. Acta. 37, 554

(53) - ROSE, I.A., SCHWEIGERT, B.S., (1953)
J. Biol. Chem. 202, 635

(54) - SMITH, E.L., MERVYN, L., JOHNSON, A.W., and SHAW, N., (1962)
Nature, 194, 1175

(54a) - SPIVEY-FOX, M.R., LUDWIG, W.J. and BARCODY, M.C. (1961)
Effects of Vit. B 12 and Methionine excretion of
formimino glutamic acid by the chick of
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 107, 723 - 727

(54b) - STOCKSTAD, E.L.R., WEBB, R.E. and SHATT, E., (1966)
effets of vit. B 12 and folic acid ou the metabolisme of
formimino glutamate, formate, and propionate in the rat
J. Nutrition, 88, 225, 232

(55) - TAYLOR, R.T., and WEISSBACH (1967 d)
J. Biol. Chem. 242, 1517

(56) - TAYLOR, R.T., and WEISSBACH, H. (1968 b)
To be published

(56a) - THENEN, S.W., and STOKSTAD, E.L.R., (1973)
effect of methionine ou specifi. folate Coenzyme Pools in.
J. nutrition, 103, 363 - 370

(57) - THORREL (1947)
Acta. Med. Scand. Suppl. 200

(58) - THOMAS, E.D., and LOCHTE, H.L. Jr. (1958)
J. Chir. Invest., 37, 166

(59) - VALENCIA, R. (1974)
à paraître in J. Physiol. Paris

(60) - VEILLARD, A., and PULLMAN, B. (1965)
J. Theoret. Biol., 8, 307

(61) - WEISSBACH, H. LADD, J.H., VOLCANI, B.E., SMYTH, R.R., and BARKER, H.A., (1960)

(62) - WEISSBACH, H. and, REDFIELD, B.G., and PETER KOFSKY, A. (1961)
J. Biol. Chem. 236, P.C. 40

(63) - WEISSBACH, H., PETER KOFSKY, A., REDFIELD, B.G., and DIEKERMAN, H., (1963)
J. Biol. Chem. 238, 3318

(64) - WEISSBACH, H., and TAYLOR, T.T., (1968)
Vitamines and Hormones, 26, 312 - 313

(65) - WHITE, J.C., LESHE, I. and DAVIDSON, J.N., (1953)
J. Path. Bacteriol. , 66, 291

(66) - ZALTA (1962)
Thèse de Doctorat es-Sciences, Paris

Vu le Président du J U R Y

Signé :

Vu le Doyen

Signé :

Vu et permis d'imprimer

Alger, le

LE RECTEUR DE L'UNIVERSITE D'ALGER

Signé :